UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1936-1937 — N° 167

CONTRIBUTION

à l'Etude de la Constitution Protido-Lipidique des Bactéries acido-alcoolo résistantes.

Thèse

présentée et soutenue publiquement le 30 Juin 1937
à la Faculté de Parmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

Walter KREYENBÜHL

Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

Monsieur le Doyen A Sartory, Président du Jury

MM. Y. Volmar, Professeur
R. Sartory, chargé du cours } Juges

IMPRIMERIE CHARLES ROCH
12, rue des Pucelles, STRASBOURG
1937

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548005_0032

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1936-1937 N° 167

CONTRIBUTION

à l'Etude de la Constitution Protido-Lipidique des Bactéries acido-alcoolo résistantes.

Thèse

présentée et soutenue publiquement le 30 Juin 1937
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

Walter KREYENBÜHL

Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

Monsieur le Doyen A. Sartory, Président du Jury

MM. Y. Volmar, Professeur
R. Sartory, chargé du cours
} Juges

IMPRIMERIE CHARLES ROCH
12, rue des Pucelles, STRASBOURG
1937

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✿, C. ❁
VOLMAR, *Assesseur*, ✿
CUVIER, *Secrétaire*, A. ✿

DOYEN HONORAIRE

M. Jadin, O. ✻, I. ✿, ❁

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ✿, C. ❁ ..	Bactériologie
	LAVIALLE, ✻, I. ✿, ❁	Botanique
	VOLMAR, I. ✿	Chimie organique
	GUILLAUME, ✻, ⌛, I. ✿, ❁	Pharmacie galénique
	LAPP, I. ✿	Chimie analytique
	(CORDIER, chargé de cours) ✿ ...	Pharmacie chimique
	(R. SARTORY, chargé de cours) ✿	Matière médicale

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	A. SARTORY	Hygiène
	LAVIALLE	Hydrologie
	VOLMAR	Chimie minérale
	GULLAUME	Zoologie
	LAPP	Pysique
	EISENMANN	Législation et Déontologie
	CORDIER	Cimie biologique
	R. SARTORY	Cryptogamie
	DUQUENOIS	Toxicologie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	R. SARTORY	Bactériolog. et Parasitologie
	COLLARD, I. ✿, ⌛	Chimie pharmaceutique
	BOHN, A. ✿	Histoire naturelle
	DUQUENOIS	Chimie et Physique

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Au Président du Jury de ma Thèse:

A Monsieur le Doyen A. SARTORY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Commandeur de la Légion d'honneur

A mes Juges:

Monsieur Y. VOLMAR

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur R. SARTORY

Chargé de cours à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de respectueuse et profonde gratitude.

R. UNIV.
BIBLIOTHEK
STRASBOURG

A MES PARENTS

Témoignage de profonde et sincère reconnaissance.

A MA TANTE

Témoignage de vive affection.

INTRODUCTION.

Depuis la découverte du bacille de la tuberculose par Robert Koch en 1892, un grand nombre de travaux ont été entrepris par les savants de tous pays pour élucider les propriétés très particulières qui se rattachent à ce microorganisme. La résistance du bacille une fois coloré vis-à-vis des acides et de l'alcool le différenciait sensiblement de tous les autres microorganismes pathogènes. En 1898 Mœller a trouvé dans le lait et dans le foin des bâtonnets résistant à l'alcool et aux acides (bactérium phlei, Grasbacillus I, Grasbacillus II, bactérium lacticola). Cette découverte a démontré qu'il était impossible de différencier le bacille de la tuberculose une fois coloré par la méthode Ziehl-Neelsen d'une façon absolue.

Par des recherches sérologiques et immunologiques on est arrivé à caractériser différents composants de l'organisme. Les méthodes employées étaient parfois d'une brutalité telle, qu'il était impossible d'établir clairement d'une part la structure complexe des constituants de la cellule bactérienne, et d'autre part leurs liaisons chimiques, car ces corps ont un très grand poids moléculaire.

Nous avons pensé pouvoir tirer des conclusions au point de vue de l'acido-résistance, d'une part de la relation des globulines et des lipides combinés avec elles, et d'autre part de la relation des albumines et de leurs lipides. Les progrès de la chimie biologique des dernières années, réalisés en particulier par des biologistes français sur la composition du sang dans l'organisme malade et normal et leur composition quantitative au

point de vue albumines, globulines et lipides, nous a tracé le chemin pour essayer d'analyser chimiquement les bâtonnets acido-résistants sans avoir recours aux acides et bases fortes ou à des solvants organiques et sans amener un changement ou même une destruction des différents complexes chimiques de la cellule bactérienne.

Ces travaux ont été effectués au laboratoire de Bactériologie et de Cryptogamie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg.

A cette occasion, j'exprime ma profonde gratitude à M. A. Sartory, Doyen de la Faculté, de la bienveillance et du grand intérêt qu'il a portés à mon travail.

J'exprime également mes sentiments de reconnaissance à MM. les Professeurs Y. Volmar et R. Sartory, qui ont bien voulu faire partie du jury de notre thèse.

Ma reconnaissance va également vers M. J. Meyer, assistant à la Faculté de Pharmacie, pour les conseils qu'il m'a donnés avec tant de complaisance et la contribution amicale apportée à ce travail.

Le plan adopté pour l'exposition de notre sujet est le suivant: Le premier chapitre traite l'histoire de l'analyse chimique des bacilles acido-résistants. En particulier sont énumérés les travaux américains, allemands et japonais dans les 3 dernières années.

Le second chapitre traite la morphologie et la culture des bacilles acido-résistants en vue de l'obtention d'une récolte abondante de bactéries.

Le troisième chapitre est consacré à l'exposé de nos études sur l'extraction des Globulines et Albumines labiles des bactéries, à l'aide d'une solution physiologique de chlorure de sodium. Nous avons appelé «Albumines labiles» et «Globulines labiles» des produits passant facilement dans l'eau ou dans une solution physiologique.

Le quatrième chapitre traite l'extraction des Globulines et Albumines stables au moyen d'une solution de KOH alcoolique. Nous appelons «Globulines stables» et «Albumines stables» des corps qui sont susceptibles d'être solubilisés par la potasse alcoolique.

Le cinquième chapitre est consacré à la détermination des Globulines et Albumines obtenues par macération dans une solution de sulfate d'ammonium.

Dans le sixième chapitre nous examinons les propriétés dites «acido-résistance» et «alcoolo-résistance» des produits de fractionnement.

Enfin notre travail se termine par les conclusions générales résumant nos résultats et par les notes bibliographiques que nous avons eu l'occasion de réunir au cours de nos études. La question est trop vaste pour envisager intégralement ici tous les problèmes de la chimie biologique bactérienne.

Il serait illusoire de vouloir apporter une solution complète et définitive au sujet que nous traitons. Le but que nous nous sommes proposé nous semble de toute façon atteint, si nous avons réussi à indiquer un chemin nouveau pour l'analyse chimique de la constitution complexe des cellules bactériennes.

Chapitre Premier.

HISTORIQUE.

La coloration spécifique du bacille tuberculeux et des autres bacilles acido-résistants est en rapport avec une substance soluble dans l'alcool et dans l'éther.

Dans un de ses travaux R. Koch a indiqué la teneur importante en substances graisseuses, présentant les caractères des corps gras, dans le bacille tuberculeux. Il considère ces substances comme deux acides gras différents et non saturés, dont l'un est facilement soluble dans l'alcool à froid, tandis que l'autre — et c'est à celui-là qu'il attribue principalement la propriété de l'acido-résistance — n'est solubilisé que dans l'éther ou dans l'alcool bouillant.

L'hypothèse d'une substance grasse se révélait fausse, puisque d'après Aronson la substance soluble n'a pas l'apparence d'une cire, mais correspond bien chimiquement à ce dernier corps. On différencie, en effet, les graisses et les cires par le fait qu'à la saponification les vraies substances grasses sont entièrement solubilisées en formant des savons, et de la glycérine, tandis qu'à la saponification des cires, il reste une partie insoluble qui a la composition d'un alcool gras supérieur.

En effet, Aronson a identifié un alcool qui n'était pas une cholestérine. En même temps, il constata que

par une extraction répétée avec les meilleurs dissolvants de corps gras on n'arrivait pas à enlever toute la cire du bacille tuberculeux. Une grande partie est restée positive à la coloration de Ziehl; ce n'est qu'à la suite de procédés chimiques énergiques — il employait un mélange d'alcool-éther à 1% d'acide chlorhydrique à la température d'ébullition — qu'il réussit à décolorer entièrement le bacille tuberculeux.

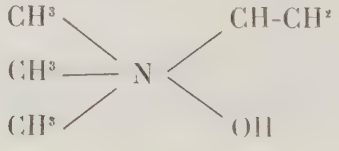
Deycke a constaté que la coloration positive de Ziehl-Neelsen du bacille tuberculeux et des autres bactéries acido-résistantes était due aux acides gras et il croit qu'il n'y pas de raison d'admettre une cire; de même Weiss prétend que l'existence d'une substance cireuse est une erreur.

La difficulté de dissoudre les graisses et cires des bactéries de l'enveloppe bactérienne a déterminé Aronson à employer le trichloréthylène. Après une macération de trois jours dans ce solvant cet auteur n'a constaté ni d'éléments acido-résistants ni de granules de Much.

Il faut mentionner que cette technique aboutit à la formation d'acide chlorhydrique et dans ce cas l'extraction donne par conséquent d'autres résultats.

Deycke et Much ont indiqué un nouveau procédé pour la dissolution des bacilles acido-résistants. Il consiste dans l'action d'une solution de choline ou neurine à 25% à la température de 37°.

Nous avons constaté qu'aucun de ces corps n'est capable de dissoudre les bacilles acido-résistants. Ce phénomène est dû à l'alcalinité assez prononcée de la substance dissolvante employée. La formule de la neurine est la suivante:



De même que les corps mentionnés, l'hydrate de tétraméthylène-ammonium dissout également les bactéries. Vu l'alcalinité très prononcée de ces bases d'ammonium, celles-ci détruisent les acides gras et les cires à poids moléculaire élevé, de même que les substances protidiques, de façon que leur structure moléculaire ne soit plus décelable.

Nos expériences ont confirmé cette hypothèse en employant de la potasse alcoolique au cours de nos expériences.

Il est impossible d'éliminer complètement les graisses et les cires par les moyens habituels employés dans les méthodes se rapportant à la chimie des graisses. L'extraction alcoolique, en présence d'acide chlorhydrique, nous donne les mêmes résultats que celle à l'aide de la benzaldéhyde et du chlorure de benzoyle.

Par l'application de ces trois méthodes toutes les substances albuminoïdes restent fixées dans la cellule bactérienne, sans passer dans le solvant qui ne dissout que les graisses et lipoïdes. Ces corps sont d'une composition excessivement compliquée. Le mélange des graisses après extraction est fortement acido-résistant. La séparation des différents composants nécessite une dissolution par l'alcool bouillant. Après refroidissement, les graisses neutres et leurs alcools correspondants précipitent. On filtre, et dans le filtrat se trouve un mélange d'acides gras libres et des composés lipoïdiques. Les acides gras ainsi obtenus sont fortement acido-résistants. Ils ont la propriété de communiquer l'acido-résistance à des substances qui ne le sont pas naturellement, tel que les graisses neutres et les alcools correspondant à ces graisses. Ce pouvoir vecteur de l'acido-résistance se fait encore en grande dilution.

Toutes ces expériences ont mené Deycke à la conclusion suivante: la coloration des bactéries acido-résistantes est due à la présence de corps présentant le

caractère de graisse. Parmi ces corps les acides gras libres seuls communiquent aux bactéries la propriété de résister aux acides. Ce fait a déjà été prouvé par R. Koch.

L'action des graisses neutres ne joue qu'un rôle indirect. On a trouvé que justement ces graisses neutres empêchent la pénétration du colorant dans le bacille et de ce fait celui-ci devient très difficilement colorable. La résistance extraordinaire des bactéries vis-à-vis des acides n'est donc pas due à la présence des graisses neutres, qui interviennent seulement comme inhibiteurs du pouvoir tinctorial des colorants.

D'après les recherches de Fontès, l'acido-résistance est due à la présence de corps ayant le caractère des albumines et Helbling croit voir dans la chitine la substance douée de cette propriété.

La cire et les composants insaponifiables, injectés à des lapins, font apparaître chez ces animaux des cellules géantes et sont donc des corps, occasionnant une augmentation pathologique des cellules vivantes. Par leur acido-résistance ces cires ont pu être identifiées dans les cellules géantes.

Ehrlich admit l'existence d'une enveloppe de nature cireuse (Aronson) que les colorants traversent très difficilement. Bulloch et Macleod arrivèrent au même résultat en extrayant ces corps à l'aide d'alcool et en les identifiant ainsi.

La cire a une composition toute spéciale, elle serait considérée comme un phosphatide complexe, contenant beaucoup d'hydrate de carbone.

Tamura attribua l'acido-résistance à un alcool d'un poids moléculaire très élevé ($C^{29}H^{56}O$) et Anderson identifia un acide dioxycarbonique de formule $C^{94}H^{188}O^4$. Cet acide dioxycarbonique possède une acido-résistance seulement à l'état de corps libre non

éthéré. Mais comme cet acide est lié dans la bactérie à des sucres, le problème de l'acido-résistance n'est nullement résolu.

D'ailleurs Anderson n'a jamais trouvé l'alcool de Tamura (appelé Mykol). Il est vrai qu'il n'a jamais attaqué la substance bactérienne aussi énergiquement que Tamura ne l'avait fait. Signalons enfin les travaux de Brisconi, qui pulvérisa finement dans un mortier d'agate les bactéries desséchées et provoqua par ce changement physique profond la perte de la propriété d'acido-résistance.

Knorff-Petersen et Siese utilisèrent la méthode de l'analyse micro-chimique de Schumacher et arrivèrent à cette conclusion que l'acido-résistance est conditionnée par les lipoalbuminoïdes chimiquement différents.

St. Mudd et E. Mudd ont trouvé que les bactéries acido-résistantes placées dans la couche de séparation d'un mélange eau/huile (tricaprylène), sont immédiatement imbibées d'huile et passent dans ce milieu, ce qui n'est pas le cas pour les autres bactéries. Comme cette propriété des bactéries acido-résistantes se perd par une extraction répétée à l'alcool, l'acido-résistance se maintenant, ils en concluent que la structure superficielle des bactéries acido-résistantes est de nature lipoïdique.

Isabolinsky et Gitowitsch complètent les communications antérieures à la suite de nouvelles recherches, au cours desquelles ils constatèrent que la lécithine a un pouvoir lipolytique pour les différentes variétés de bacilles tuberculeux. Ils prirent de fines suspensions de bacilles tuberculeux, d'origines différentes, dans de l'huile d'olive ou de l'huile de foie de morue. Une partie seulement des variétés perdit après trois mois son acido-résistance.

De son côté, Toda remarqua que d'autres bacilles acido-résistants perdaient complètement leur acido-résistance lorsqu'on les conservait pendant cinq jours à

une température de 37° dans l'huile de térébenthine, de citron ou de thym.

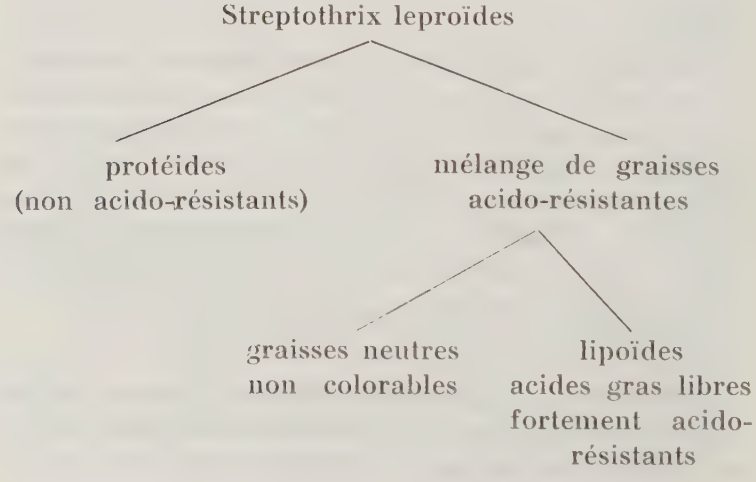
Mc Inkin employa une solution d'acide oléique à 2% dans l'alcool à 80%. Après trois jours les bacilles avaient perdu leur acido-résistance dans ce mélange.

Bossevin a fait des constatations suivantes:

En faisant des solutions tampon de pH différent avec des bactéries acido-résistantes, il a pu montrer la relation qui existait entre la perte de cette acido-résistance et la concentration en ions H. C'est ainsi que le bacille tuberculeux perd son acido-résistance en cinq minutes à l'ébullition dans une solution d'un pH 1,3; pour un pH 6 il faut cinq jours. Il en conclut que l'acido-résistance est en relation avec des substances hydrosolubles.

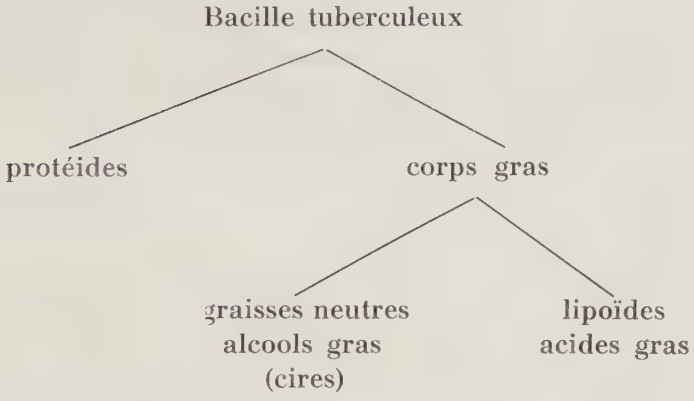
La biochimie des bâtonnets acido-résistants se conçoit mieux lorsqu'on prend à titre de comparaison un autre microorganisme acido-résistant: le *streptothrix leproïdes*. Il se compose essentiellement de protéides et d'un mélange de corps gras. Sa composition est la suivante:

Tableau N° 1



On n'y trouve pas d'alcools gras supérieurs, de cires, de parties insaponifiables. Par conséquent, attribuer l'acido-résistance à des cires ou à des alcools gras supérieurs est une faute. Les acides gras libres seuls entraînent l'acido-résistance. Dans le cas du bacille tuberculeux les conditions sont un peu différentes parce que la liaison corps gras/protéides est plus solide. C'est ainsi que le bacille tuberculeux ne perd pas ses graisses, même pas par l'action prolongée de l'éther. Sa composition est la suivante:

Tableau N° 2

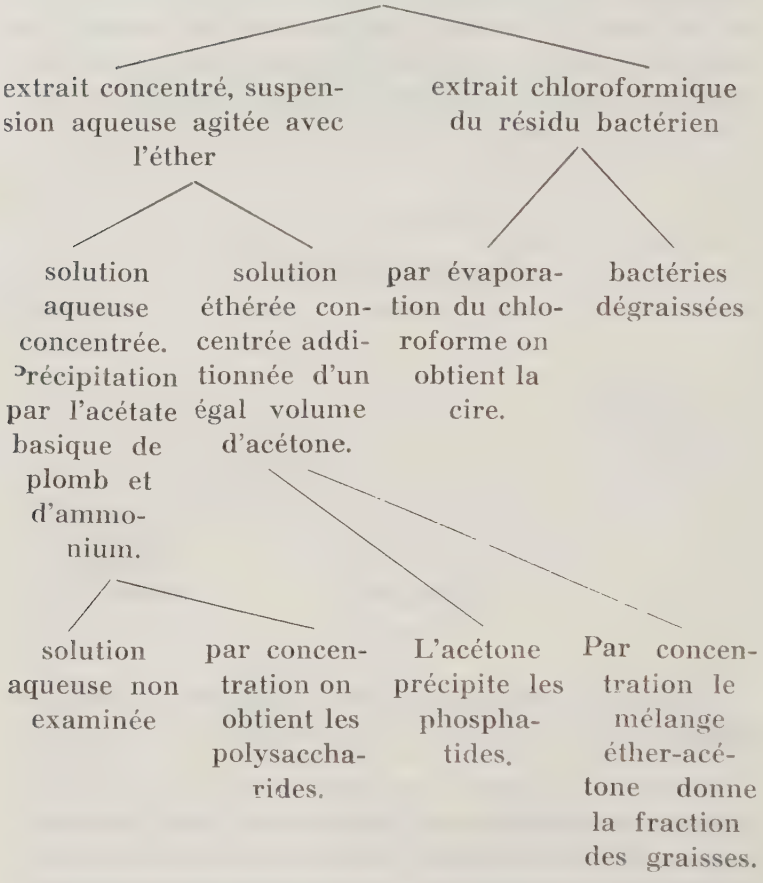


Outre ces corps les bacilles contiennent encore des substances de soutien: de la cellulose et de la chitine.

Pour différencier les bâtonnets acido-résistants saprophytes des bâtonnets pathogènes, Toda fait remarquer que les saprophytes résistent moins à la chaleur; d'autre part les bactéries saprophytes présentent vis-à-vis du bleu de Méthylène une affinité plus prononcée que les organismes virulents.

L'analyse sérologique et chimique plus approfondie des différentes fractions du bacille tuberculeux n'a été entreprise à fond que dans les dernières années. Chargraff a fractionné les différentes parties du bacille d'après le schéma suivant:

Tableau N° 3



Pour l'analyse, les auteurs disposaient de 3.000 à 4.000 gr. de bacilles tuberculeux débarrassés de leur milieu de culture. Les résultats de cette analyse sont exposés dans la conclusion des travaux d'Anderson.

En collaboration avec la National Tuberculosis Association et l'institut de Rockefeller, Anderson a

entrepris systématiquement une analyse chimique des lipides et polysaccharides des bacilles acido-résistants. Commencés en 1927, les travaux se poursuivent toujours et se basent sur de nombreux auteurs qui ont publié antérieurement leurs travaux sur la chimie du bacille tuberculeux.

Ces différents auteurs sont: Hammerschlag, de Schweinitz, Klebs et Dorset, Ruppel, Aronson, Levene, Kresling, Bullock, Macleod, Baudran, Auclair et Paris, Tamura, Agulhon et Frouin. Ils semblaient tous avoir été gênés par le manque de matériel. L'identification certaine des substances isolées leur était aussi impossible. Jusqu'à présent, Anderson a donné des comptes rendus de ses analyses de bacille tuberculeux, type humain, type aviaire et du bacille de la lèpre.

Les bactéries sont cultivées sur le milieu synthétique de Long.

Asparagine	5 gr.
citrate d'ammonium	5 gr.
monophosphate de potasse	3 gr.
carbonate de sodium	3 gr.
sulfate de magnésium	1 gr.
citrate de fer et d'ammonium ..	0,05 gr.
glycérine	50 gr.
eau	1000 gr.

Il a mis au point une méthode qui évite toute action énergique, permettant de faire une extraction des bacilles humides et d'obtenir les corps gras, solubles dans l'acétone, les phosphatides insolubles dans l'acétone et la cire soluble dans le chloroforme.

Le schéma de ces séparations est donné par le

Tableau N° 4

Bactéries
filtration sous le vide, lavage à l'eau, traitement par alcool-éther 1:1

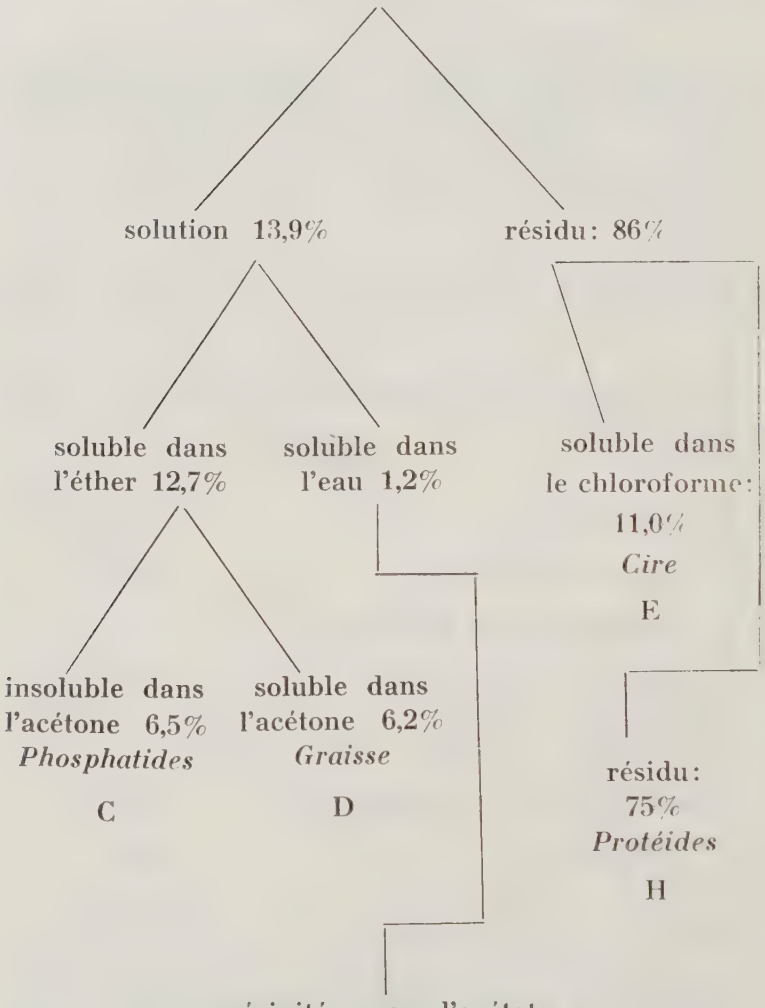


Tableau N° 5

Composition quantitative des bactéries acido-résistantes d'après Anderson.

	Gras-bacillus	bacille tub. type bovin	bacille tub. type aviaire	bacille tub. type humain	bacille de la lèpre
% Phospha-tide	0,6	1,5	2,3	6,5	2,3
corps gras	2,8	3,3	2,2	6,2	6,5
cire	5	3,5	10,8	11	10
lipides totaux	8,4	13,4	15,3	23,8	28,8
Polysaccha-rides	3,9	1,1	1	0,9	0,9
résidu sec	88	86	84	75	80
gr. » »	2.783	3.370	2.943	2.902	3.390
» » » total	3.173	3.941	3.515	3.869	4.266

Ce tableau nous montre que le pourcentage en lipoïdes va en augmentant du Grasbacillus au bacille de la lèpre. Le pourcentage d'hydrate de carbone par contre, va en diminuant. Le bacille de la lèpre contient 30% de lipides, mais ces lipides ne se laissent pas extraire totalement par un traitement à l'alcool-éther en milieu neutre. Le bacille tuberculeux de l'homme est le plus riche en phosphatides, étant donné qu'il en contient 6,5%. Ce fait est excessivement important, car les phosphatides sont les produits de clivage des bactéries biologiquement les plus intéressantes.

Les polysaccharides (fraction B) des bacilles acido-résistants donnent après acétylation 40% de tréhalose dans le cas du Grasbacillus. Après saponification du sucre, on trouve un point de fusion correspondant exactement à celui de ce sucre, de même le pouvoir rotatoire et la forme cristalline correspondent au tréhalose. Les sucres qui n'ont pas été identifiés sont probablement des combinaisons de structure compliquée contenant des pentoses.

Les polysaccharides qui ont été obtenus à partir du bacille tuberculeux de l'homme contiennent 30% de Glycose, 27% de Mannose, 3% d'Arabinose, un peu d'Inosite inactif et d'autres sucres de réaction acide, mais qui n'ont pas encore été analysés de façon précise.

Les bacilles tuberculeux, type aviaire, contiennent dans la fraction B 66% de Mannose et d'Inosite. Dans ce cas particulier il s'agit probablement d'un trisaccharide.

Tableau N° 6

Polysaccharides des bactéries acido-résistantes.

Bacille Tuberc. Type humain	Bacille Tuberc. Type aviaire	Grasbacillus
Polysaccharides	Trisaccharides	40% Tréhalose
30% Glycose 27% de Mannosse 3% d'Arabinose peu d'Inosite inactif et de sucre acide de constitution inconnue.	2 Mol Mannose 1 Mol Inosite inactif	pentose inconnu

Les phosphatides insolubles dans l'acétone (fraction C) des bactéries acido-résistantes contiennent un mélange d'acides gras saturés et non saturés. La solution alcoolique des acides gras a été neutralisée par de la potasse aqueuse pour être précipitée ensuite sous forme de savon de plomb. Une partie de ces savons est soluble dans l'éther et contient un mélange d'acides gras liquides saturés. Ils sont accompagnés de toute une gamme de corps gras de structure inconnue. Seuls les acides gras liquides saturés obtenus à partir du bacille tuberculeux de l'homme ont pu être décomposés en fractions optiquement actives. Par décomposition des sels de Pseudo-thio-urée et des acides à partir des phosphatides du bacille tuberculeux humain, Anderson est arrivé à isoler des combinaisons actives se rapprochant à l'acide stéarique. Il leur a donné le nom d'acide tuberculo-stéarique. Le poids moléculaire de ces acides varie de 294 à 380.

A partir de la deuxième fraction des sels de Pseudo-thio-urée, Anderson a pu isoler des acides gras à grand poids moléculaire, doués d'un pouvoir rotatoire dextrogyre. Ces acides sont biologiquement actifs et on leur donne le nom d'acide phtionique.

Tableau N° 7

Les acides dans le phosphatide des bactéries acido-résistantes.

	acides saturés solides	acides hydrogénés	acides liquides saturés
Grasbacillus	acide palmitique	acide palmitique	acide gras se rapprochant de l'acide tuberculo - stéarique P. F. 8-11° P. M. 380-383
Bacille tub. type aviaire	acide palmitique acide stéarique	acide stéarique	acide gras se rapprochant de l'acide tuberculo - stéarique
Bacille tub. type bovin	acide palmitique	acide stéarique	acide gras se rapprochant de l'acide tuberculo - stéarique P. M. 306
Bacille tub. type humain	acide palmitique	acide stéarique	acide gras se rapprochant de l'acide tuberculo - stéarique P. F. env. 10° P. M. 313 acide phtionique P. M. 342 D = + 3,54
Bacille de la lèpre	acide palmitique acide d'un P.M. 467	acide stéarique acide palmitique	acide gras se rapprochant de l'acide tuberculo - stéarique P. F. 14-15° P. M. 294

Les caractéristiques des acides gras solubles dans l'acétone des bactéries acido-résistantes sont résumées dans le tableau N° 8. On remarquera particulièrement un grand pourcentage d'insaponifiable. Une partie peut provenir de la cire, entraînée accidentellement. Il n'est pas dit que cette cire soit liée aux graisses. L'indice d'iode nous indique un pourcentage très petit d'acides gras non saturés: l'indice d'acidité par contre est très élevé; ceci fait penser à l'action de la lipase qui provoque la décomposition de ces graisses.

Tableau N° 8.

Caractéristiques de la graisse des bactéries acido-résistantes.

	Gras-bacillus	bacille tub. type bovin	bacille tub. type humain
Point de fusion	10°	38°	33°
Indice d'iode	72,3	48,4	52,6
Indice de saponification	157,5	171,2	203,6
Indice d'acidité	59,4	117,5	60,3
Indice d'acétyl	98,1	53,7	143,2
Indice de Reichert-Meissel	1,98	4,15	3,96
Insaponifiable	24,6	13,1	11,9
Acides gras tot.	71,3	83,9	83,33
Acides gras libres.	—	—	27,5
Ethers neutres	—	—	60,59
Acides saturés solides	19,4	32,4	30,38
Acides saturés liquides	21,4	18,6	38,06
Produits solubles après hydrolyse	—	—	6,61

La glycérine n'a pu être identifiée après hydrolyse du Grasbacillus. Ce sont plutôt des acides gras qui sont combinés à des composés se rapprochant des sucres. Nous nous trouvons donc en présence d'un corps nouveau, inconnu jusqu'à présent dans la chimie des graisses.

Le sucre correspondant au Grasbacillus a pu être décomposé en deux parties, l'une soluble dans l'alcool et fortement réductrice, l'autre non réductrice. La séparation des acides gras a été effectuée d'après le mode opératoire utilisé pour les phosphatides. Anderson a trouvé un acide gras oxydé inconnu jusqu'à présent. Cet acide est optiquement actif. Son P. M. est 488. Les recherches concernant les acides gras liquides sont très intéressantes. Il semblerait que l'acide tuberculo-stéarique se trouve dans la graisse des trois bactéries étudiées. Dans le bacille tuberculeux, type bovin, nous trouvons à côté de celui-ci au moins un acide à poids moléculaire élevé. Le bacille tuberculeux, type humain, nous fournit de l'acide phtionique presque pur, après fractionnement de la partie à point d'ébullition élevé. Ce fractionnement est suivi d'une cristallisation à l'état de sels de baryum après évaporation du solvant alcoolique. L'acide phtionique est un isomère de l'acide cératique. La formule globale est $C^{26}H^{52}O^{2}$. En ce qui concerne les protides des bactéries acido-résistantes, on rencontre les mêmes difficultés qu'ailleurs pour leur identification. Jusqu'à présent on a pu identifier avec sûreté dans les bacilles acido-résistants des amino-acides et des bases comme le tryptophane, la tyrosine, la valine et la proline.

D'après Coghill l'acide nucléique du Grasbacillus a une autre composition que l'acide tuberculinique. Ce dernier acide est caractéristique pour une substance végétale. Il contient de l'uracyle au lieu de thymine et au moins 20% de pentoses et pas d'hexoses. Coghill, se basant sur la différence de la composition des nucléo-protéides, propose une classification chimique des bactéries.

En résumé, nous voyons que l'analyse chimique des bacilles acido-résistants a donné lieu à des résultats de grandes valeurs. Les polysaccharides libres des bactéries sont composés de différents sucres. Un de ces corps est l'arabinose qu'on rencontre rarement dans la nature. Ses phosphatides paraissent appartenir à une nouvelle classe de combinaisons phosphorées. Comme nous avons vu la proportion du P:N n'est pas 1:1 comme pour les phosphatides vraies. Elle varie entre 1,8:1 chez le bacille Calmette-Guérin et 5,8:1 chez les Grasbacillus. L'absence de lécithine a pu être prouvée par le fait que ces phosphatides ne contiennent pas de choline.

On rencontre à côté des combinaisons glycérophosphoriques des poly-alcools sous forme d'hydrate de carbone. Après hydrolyse par un acide ils donnent principalement du mannose, de l'inosite et des sucres acides. La matière grasse ne contient pas de glycérine comme toutes les autres graisses d'origine animale et végétale. La glycérine est remplacée par du sucre.

La composition de la cire est très particulière. Elle serait plutôt une combinaison de phosphatides complexes avec une grande teneur en hydrate de carbone. L'acido-résistance serait dû à un acide dioxycarbonique de grand poids moléculaire dont la formule serait la suivante: $C^{94}H^{188}O^{4}$. On ne trouve pas d'autres acides gras à poids moléculaire élevé.

Les acides gras des cires sont également combinés à des sucres et non à des alcools monovolants. Par hydrolyse des hydrates de carbone, on obtient 50% de d-arabinose et de d-galactose. La cire purifiée du bacille tuberculeux, type humain, contient également des acides organiques phosphorés et un composé azoté qui par décomposition donne du glucosamine.

Si nous recherchons les produits de décomposition biologiquement actifs nous trouvons que, exception faite de la tuberculine, certains produits lipoïdiques peuvent être identifiés. L'acide phtionique dextrogyre du bacille tuberculeux type humain est le plus actif. Les phospha-

tides du Grasbacillus et du bacille de la lèpre sont biologiquement actifs à des degrés différents, quoiqu'ils ne contiennent aucun acide à pouvoir rotatoire. L'acide tuberculo-stéarique du bacille tuberculeux, type bovin, est également biologiquement actif; celui du type aviaire par contre ne l'est pas.

Chapitre II.

ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DU GRASBACILLUS. ESSAIS CULTURAUX SUR MILIEUX NATURELS OU SYNTHETIQUES POUR L'OBTENTION DE RECOLTES OPTIMAS.

Le Grasbacillus (Bacterium phlei; Mycobacterium phlei; Timothégrasbacillus, Bacille du foin) se trouve sur l'herbe à Timothé: (Phleum pratense). Comme le bacille de Koch, il résiste à la décoloration au moyen d'acides et d'alcool. Il se colore donc en rouge par la méthode de Ziehl-Neelsen. En général, ces bactéries ont la forme de bâtonnets fins de 1-4μ de long et de 0,2-0,4μ d'épaisseur. Ils ont parfois à l'une ou aux deux extrémités un renflement. Souvent les bâtonnets sont légèrement courbés. Quelquefois on remarque de petits groupes en chaînette de deux à trois éléments. Le Grasbacillus est gram-positif.

Les cultures sur tous les milieux présentant l'alcoolo- et l'acido-résistance. Nous avons pu constater chez le bacille tuberculeux, que nous avons toujours pris comme éléments de comparaison dans la vérification de l'acido-alcoolo-résistance, une décoloration partielle après cinq mois de culture. Le Grasbacillus, lui au contraire, reste toujours Ziehl-positif. Les jeunes bactéries présentent une acido-résistance particulièrement forte. Elles supportent bien un traitement à l'acide sulfurique

à 40% pendant dix minutes ainsi que l'action de l'alcool. Dans les vieilles cultures le Grasbacillus perd un peu de son acido-résistance.

Il n'est agent pathogène que chez les animaux à sang froid où il produit une infection.

Mœller a trouvé que les cobayes inoculés par des cultures de Grasbacillus pures meurent après quelques jours. A l'autopsie on trouve des bactéries dans le sang, dans les ganglions; on constate dans le gros intestin, dans l'intestin grèle et dans les poumons des cavernes suppurantes.

Le développement de ces bactéries sur milieu pommes de terre glycériné est très luxuriant. Le voile, blanc au début du développement, puis gris blanc et gris, s'étend peu à peu sur toute la surface du milieu et forme des rides de 5 mm. de hauteur. Le milieu pommes de terre glycériné est le plus favorable au développement de ces bactéries.

Sur Gélose glycérinée le développement est très abondant à 37°. Après deux jours on trouve des petites colonies en forme de gouttelettes d'eau qui ne tardent pas à se fusionner pour donner un revêtement jaunâtre.

Sur lait écrémé le développement est très rapide; il se forme à la surface une pellicule fragile, le liquide prend une teinte brunâtre et ne se coagule pas.

Les essais pour trouver un milieu synthétique favorable et simple, ont conduit Lobstein à se servir de la formule suivante:

Phosphate de potasse	1,5
Phosphate de magnésium	1,0
Glycérine D 1,26	40,0
Acide citrique	1,0
Asparagine	10,0
Eau distillée q. s. p.	1000,0

On ajoute de l'acide citrique pour empêcher la précipitation du phosphate de magnésium. Ce milieu

de culture, de composition très simple et chimiquement déterminé, s'est montré au cours de nos travaux peu favorable au développement du bacille.

Le milieu suivant (milieu J. Meyer) a donné des meilleurs résultats.

Peptone	5,0
Glycose	5,0
Chlorure de sodium	1,0
Glycérophosphate de fer	0,025
» de magnésium	0,025
» de sodium	0,05
Glycérine D 1,26	15,0
Jus de pommes de terre	250,0
Eau q. s. p.	500,0

80 gr. env. de pommes de terre pelées et coupées en petits morceaux sont cuites à petit feu pendant une heure et on passe à travers une toile. On ajoute cette solution aux autres composants et on complète à 500 gr. avec de l'eau. Le milieu est ajusté à un pH de 6,7. Nos recherches antérieures ont prouvé que cette concentration en ions H était la plus favorable à la culture du Grasbacillus.

Dans ces analyses Georgescu ajoute 30 cc de potasse normale à 1 litre de milieu de culture (milieu Lobstein) et considère le pH ainsi obtenu comme optimum. Ces recherches présentent certainement une erreur.

On répartit ce milieu de jus de pommes de terre dans des Erlenmeyer qu'on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°. On ensemence le milieu avec des cultures à propriétés fixées par plusieurs repiquages et on les place à l'étuve à 37°.

Le développement du bacille sur ce milieu de jus de pommes de terre glycériné est très rapide. Après 37 heures toute la surface est recouverte d'un voile blanc, qui se plisse après huit jours et grimpe le long des parois de l'Erlenmeyer.

Il est important de rappeler que les cultures sur milieu artificiel ne s'effectuent pas dans les mêmes conditions que celles réalisées naturellement sur phleum pratense ou que celles existant pour les bacilles tuberculeux dans une caverne. Les recherches de Terroine et Frouin ont prouvé que les cultures sur milieu riche en glycérine ne répondent pas aux mêmes conditions que celles rencontrées par le parasite dans son milieu naturel, où la teneur en glycérine est bien moindre.

Mais comme la teneur en corps gras, en hydrates de carbone et en protéides dépend de la composition du milieu de culture, il est impossible de trouver analytiquement le taux des composants du bacille correspondant à celui que l'on rencontre dans la nature. Les résultats présenteront toujours un optimum de corps gras dû aux conditions favorables de culture. Finalement la composition dépend aussi de la souche bactérienne et il faut admettre que le pouvoir pathogène du bacille est en rapport avec sa composition chimique.

Le tableau suivant montre que la composition des bactéries dépend à la fois du milieu et de l'âge des cultures.

Tableau N° 9.

Age de la culture jours	Milieu de culture	Teneur en azote total %	Azote soluble %	Albuminoïdes %
20	Glycérine	8,320	1,401	42,334
20	Glycérine + Glycose	9,345	1,728	47,616
20	Glycose	11,614	2,084	59,562
40	Glycérine	7,180	1,826	33,462
40	Glycérine + Glycose	8,524	2,180	39,650
40	Glycose	10,246	2,450	48,725

Ce tableau prouve que la quantité des albuminoïdes atteint un maximum au cours du développement et qu'après 20 jours le bacille continue à vivre aux dépens de ses propres albuminoïdes. Il prouve également que la teneur en albuminoïdes dans les cultures avec glycérine et glycose, et particulièrement dans les cultures avec de la glycose pure, est plus forte que dans les cultures avec de la glycérine seule. La teneur en acides gras, cholestérol etc. dépend des différents milieux de culture; plus le pourcentage en glycérine est élevé, plus nous trouvons de corps gras.

Tableau N° 10.

	Glycérine		Glycérine + Glycose		Glycose	
	20 jrs.	40 jrs.	20 jrs.	40 jrs.	20 jrs.	40 jrs.
Poids des bactéries	6,116	6,301	4,564	5,697	5,440	4,610
Acides gras	0,221	0,194	0,131	0,107	0,111	0,058
Insaponifiables	0,128	0,089	0,075	0,089	0,088	0,075
Cholestérol	0,011	0,007	0,003	0,002	0,004	0,001
Indice d'iode	19,02	18,32	18,5	17,65	16,02	15,35

En considération de ces faits, nous avons toujours employé par la suite le milieu J. Meyer.

Chapitre III.

EXTRACTION DES GLOBULINES ET ALBUMINES LABILES DES BACTERIES AU MOYEN D'UNE SOLUTION PHYSIOLOGIQUE DE CHLORURE DE SODIUM.

Après avoir séjourné une vingtaine de jours à l'étuve à 37°, les cultures sont filtrées à travers un filtre exempt de graisses et lavées une fois avec une solution de chlorure de sodium physiologique. Les recherches de Mesrobeanu ont démontré qu'il est possible d'isoler de certaines cultures de bactéries un produit soluble à l'eau: l'«Antigène complet». L'Antigène complet, obtenu au moyen d'extraction aqueuse, se présente sous forme d'une substance solide, jaunâtre, d'aspect écailleux, insoluble dans les solvants organiques (alcool, acétone, éther, chloroforme, benzène). Il se gonfle au contact de l'eau pour se dissoudre lentement, en donnant une solution opalescente. Cette opalescence résiste non seulement à toute filtration sur papier ou bougie, mais encore à la centrifugation prolongée à 16.000 tours par minute. A partir de ces solutions, l'Antigène peut être extrait sans dénaturation, par évaporation de l'eau dans le vide, à la température ordinaire. Si l'on chasse l'eau par évaporation au bain-marie bouillant, on dénature plus ou moins l'Antigène qui s'insolubilise sans que se produise une séparation du polysaccharide et des acides

gras. L'Antigène complet est absolument non dialysable, même à travers du collodion de très haute perméabilité.

L'Antigène complet ne précipite pas par les divers réactifs caractéristiques des protéines: acide trichloracétique, acide sulfosalicylique, réactif citro-picrique d'Esbach.

Les solutions d'Antigène complet précipitent par l'adjonction de 5 volumes d'alcool et d'acétone, surtout si le milieu est légèrement acidulé par une trace d'acide chlorhydrique. D'après Mesrobeaun, cet Antigène n'est pas une protéine. Son noyau est formé d'un polysaccharide lié à des acides gras non déterminés.

Il serait utile de débarrasser les bactéries du milieu de culture par des lavages successifs à l'aide de sérum physiologique, mais d'autre part il faut éviter la perte

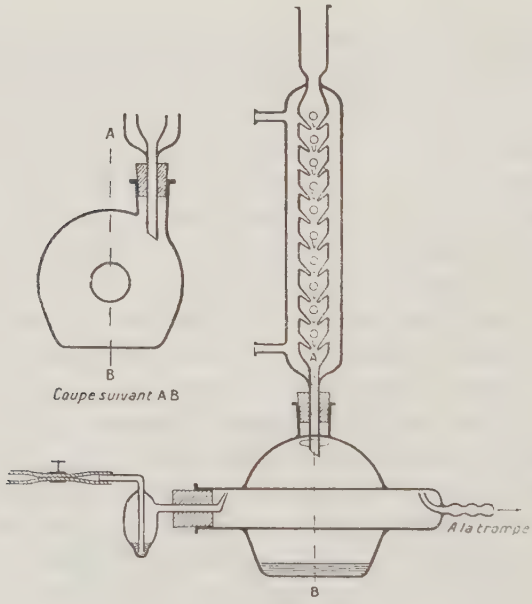


Figure 1.

des parties hydrosolubles des corps bactériens (Antigène complet).

Nous avons lavé nos cultures le plus rapidement possible en employant un minimum d'eau et un dispositif de Buchner relié à la trompe à vide. Les bactéries lavées doivent être desséchées jusqu'à poids constant.

Une dessication à plus de 40° pourrait provoquer dans la cellule bactérienne un changement chimique. Les recherches de Cueni ont montré que la température et la lumière provoquent une oxydation des lipides et des acides gras qui changent les rapports quantitatifs. A l'aide de l'appareil ci-contre, nous avons réussi à dessécher une grande partie de bactéries dans un temps très court, sans dépasser la température de 36°.

La substance à dessécher placée dans une nacelle est introduite par le manchon qui est relié à un barboteur à l'acide sulfurique et à un autre à chlorure de chaux. On fait le vide et on règle le débit d'air à une bulle par seconde. Le ballon contient de l'éther. Il est inutile d'employer une grande quantité de ce liquide: 30 ccm suffisent; on met seulement quelques grains de pierre ponce pour régulariser l'ébullition. Une flamme de veilleuse ou un four électrique chauffant directement le fond du matras, entretiendra l'ébullition pendant toute la durée de la dessication qui se fait ainsi strictement à la température de l'ébullition de l'éther. Celle-ci terminée, après avoir fermé la communication avec la trompe, on fait rentrer lentement l'air sec dans le manchon pour rétablir l'égalité de pression avec l'extérieur et on enlève la substance. On peut dessécher dans le modèle décrit une dizaine de grammes de substance. Il faut régler le robinet à vide de façon à obtenir dans la nacelle un vide constant d'environ 8 mm de Hg.

Une série de ces bactéries desséchées est ensemencée sur un milieu de cultures solides. Après un séjour de 24 heures à l'étuve on constate que les bactéries n'ont rien perdu de leur vitalité. Il se développe sur ce milieu de cultures de nombreuses colonies blanc-jaunâtres qui, colorées selon la méthode de Gram et de Ziehl, gardent

l'aspect caractéristique du Grasbacillus. La culture est restée pure.

Séparation des Globulines labiles.

Les bactéries triturées et pesées à poids constants sont mises à macérer pendant 48 heures dans une solution physiologique, puis épuisées avec le même solvant dans l'appareil de Kumagawa-Suto à +80° pendant 24 heures. L'extrait brun est réduit à consistance sirupeuse à l'abri de la lumière et dans le vide.

La solution est additionnée d'un égal volume d'une solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium. Le mélange est agité pendant quelques minutes, puis laissé au repos un quart d'heure. Les globulines précipitées sont séparées par centrifugation, d'un liquide albumineux limpide, qui est recueilli par décantation. Le mécanisme de la précipitation est le suivant: le nombre de particules ionisées diminue dans une solution protéique par addition de sulfate d'ammonium. En même temps la viscosité de la solution diminue et le pouvoir de coaguler de la protéine augmente. Dans l'hypothèse émise par J. Lœb, la protéine maintenue d'abord en suspension par les couches électriques doubles doit donc après redissolution par les sels ajoutés, être maintenue en solution par l'affinité des groupements hydrophiles pour l'eau. Si elle est ensuite coagulée, c'est-à-dire précipitée de nouveau par un excès de sel, c'est qu'il y a diminution de cette affinité des groupements hydrophiles par l'eau.

Les globulines sont mises en solution dans 2 ccm d'eau distillée et précipitées une deuxième fois par 2 ccm de la solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium.

Après une quinzaine de minutes, les globulines sont séparées par centrifugation et décantation; l'eau-mère contient la petite quantité d'albumine qui a pu être

entraînée au cours de la première précipitation; cette eau-mère est réunie à la solution albumineuse déjà séparée.

L'ensemble des opérations ainsi effectuées a permis d'obtenir d'une part, un culot de globulines débarrassées des albumines par deux précipitations, et d'autre part, des albumines en solution dans un liquide riche en sulfate d'ammonium et qui contient des sels minéraux, des hydrates de carbone, de l'urée, et d'autres substances dont il faut les séparer.

Séparation des Albumines labiles.

Comme l'a montré Macheboeuf, les albumines peuvent être précipitées à peu près quantitativement avec les lipides qui les accompagnent en augmentant la concentration en sulfate d'ammonium puis en acidifiant jusqu'à pH 3,7 ou 3,8. Au cours de cette précipitation les sels minéraux, les hydrates de carbone, l'urée restent dans les eaux-mères.

Pour effectuer cette précipitation, la solution albumineuse placée dans un tube à centrifugation, est additionnée d'une solution saturée de sulfate d'ammonium jusqu'à ce qu'il apparaisse un trouble net persistant à l'agitation; puis l'acide sulfurique N/10 est versé goutte à goutte dans le liquide agité. Les premières portions d'acide diluent le sulfate d'ammonium et font disparaître le trouble primitif, mais en continuant à verser de l'acide, on voit apparaître un précipité de plus en plus abondant. Le mélange est laissé au repos un quart d'heure, puis soumis à une brève centrifugation.

Si le pH de la solution est encore différent de 3,7 ou 3,8 on ajoute de l'acide ou de l'ammoniaque, jusqu'à ce qu'un essai avec des papiers imprégnés de solution d'indicateurs divers (rouge de méthyle, rouge Congo) indique 3,7 à 3,8. Au moyen d'une baguette de verre on remet en suspension les albumines déjà rassemblées en culot par centrifugation, puis on laisse en repos et on

centrifuge à nouveau. Le liquide surnageant ne contient plus que de très faibles quantités de protéides, on en prélève deux ccm pour vérifier le pH. Si la valeur trouvée est comprise entre 3,6 et 3,8, l'opération est terminée.

Ces opérations ont permis de séparer presque quantitativement les protéides et les lipides d'une eau-mère contenant beaucoup de sulfate d'ammonium ainsi que les sels d'urée etc. Cette eau-mère, inutile pour la suite du travail, doit être éliminée avec soin après une centrifugation assez prolongée à grande vitesse.

Dosage pondéral des globulines et des albumines.

Les globulines et les albumines ont été séparées sous la forme de précipités qu'il faut tout d'abord remettre séparément en solution acqueuse concentrée. Les globulines se dissolvent facilement dans 3 ccm d'eau distillée; les albumines par contre mises en suspension dans 10 ccm d'eau distillée ne se dissolvent que partiellement car le pH est trop bas; mais la dissolution totale est facilement obtenue par addition d'une solution diluée d'ammoniaque pour ramener le pH vers 7.

Pour doser les protéides dans les solutions d'albumines ou de globulines, nous les avons coagulées par de l'alcool bouillant et soumis ensuite à une série d'épuisements par l'alcool bouillant, puis par l'éther. Ces épuisements ont pour but de débarrasser les protéides des lipides et des sels qui les accompagnent.

Les tubes de centrifugation avec les solutions d'albumines et de globulines, sont mis dans un bain-marie à 50°. Puis on ajoute d'un seul coup dans chaque tube 30 ccm d'alcool bouillant. On mélange bien et on place les tubes dans un bain-marie bouillant jusqu'à ce que

l'alcool commence à bouillir. On transvase ensuite le coagulum des protéides dans un filtre sans graisse et préalablement taré.

Celui-ci est placé dans la cartouche de l'appareil de Kumagawa-Suto. Ensuite les albumines et globulines sont séparément épuisées par l'alcool puis par l'éther. L'épuisement à l'alcool et à l'éther a duré pour chaque solvant deux heures.

Cette opération d'épuisement exige des précautions. Notre appareil de Kumagawa-Suto a été placé dans un bain de sable qui, lui-même a été chauffé au moyen d'un four électrique facilement réglable, afin d'éviter un surchauffage. Pendant l'extraction alcoolique, une assez grande quantité de sulfate d'ammonium se rassemble au fond du récipient d'extraction. Ce fait peut occasionner de fortes secousses dans le ballon, ou une irrégularité dans l'ébullition mettant l'appareil en danger. Les fitres avec les albumines et les globulines sont desséchés à l'étuve à 50-60° et après refroidissement dans l'excicateur d'acide sulfurique, pesés dans un pèse-filtre jusqu'à poids constant.

Dosage des lipides.

Dans le précédent chapitre nous avons exposé comment, pour doser les albumines et les globulines, nous avons précipité, puis épuisé les protéides par l'alcool bouillant, puis par l'éther; les liquides alcooliques et éthérés obtenus au cours de ces opérations contiennent les lipides, le cholestérol et de petites quantités de pigments qui avaient accompagné les albumines et les globulines lors de leur séparation, ainsi qu'une grande quantité de sulfate d'ammonium.

Ces solutions alcooliques et éthérées sont évaporées à une température aussi basse que possible par distillation sous pression réduite jusqu'à obtention d'un résidu pâteux. Celui-ci est repris par de l'éther anhydre qui dissout les lipides, sans toucher aux sels. Il est très

important que l'éther soit absolument anhydre. Le résidu contenu dans le ballon d'évaporation est constitué pour la plus grande part de lipides. Le sulfate d'ammonium est très facilement soluble dans l'eau et de légères traces d'eau, introduites avec l'éther, pourraient amener une augmentation du taux lipidique. Pour obvier à cet inconvénient et pour obtenir un éther absolument anhydre nous avons conservé ce solvant pendant plusieurs jours sur du sodium métallique. Au moment où le dégagement gazeux avait complètement cessé, ce solvant a été distillé avec précaution en présence de sodium métallique et le distillat a été conservé toujours en présence de petits morceaux de sodium dans de petits flacons hermétiquement fermés. Cet éther absolument anhydre a donc été employé pour dissoudre le résidu sec provenant de l'épuisement des protéides dans l'appareil de Kumagawa-Suto. La solution éthérée est alors filtrée sur papier dégraissé en évitant toute condensation d'eau atmosphérique. Le ballon et le filtre sont rincés à plusieurs reprises par l'éther anhydre. Le filtrat et les liquides de lavage sont recueillis dans une fiole tarée, l'éther est chassé par évaporation dans le vide, puis, la fiole est placée dans un dessiccateur et pesée jusqu'à poids constant. Pour éliminer toute trace de sel, les lipides desséchés sont repris une deuxième fois par l'éther anhydre et filtrés de nouveau dans une fiole tarée; l'éther est chassé par évaporation dans le vide et le résidu est pesé après séjour dans le vide et dans le dessiccateur jusqu'à constance de la tare.

La dissolution et la filtration répétées des lipides sont absolument nécessaires si l'on veut obtenir des valeurs rigoureusement exactes. Par la première filtration qui est souvent retardée, il entre, malgré toutes les précautions, une petite quantité de sulfate d'ammonium en solution. Ce phénomène peut se contrôler facilement par le fait qu'après la deuxième mise en solution au moyen de l'éther anhydre, il reste un léger précipité dans le ballon. Ce dépôt est formé par le sulfate d'ammonium.

Le tableau suivant montre les valeurs obtenues:

Tableau N° 11.

Les Albumines et les Globulines labiles du Grasbacillus.

	Analyse N° 1	Analyse N° 2	Moyenne	%
Poids sec des bactér.	6,4720	5,2016	5,8368	
Extraction aqueuse	1,6532	1,4408	1,5470	26,5
Globulines	0,0170	0,0034	0,0102	0,17
Lipides des gobul.	0,0084	0,0068	0,0076	0,13
Albumines	0,1493	0,1203	0,1348	2,36
Lipides des album.	0,0082	0,0076	0,0079	0,13

Le pigment coloré qu'on rencontre dans presque tous les bacilles est lié aux globulines labiles, on peut l'isoler par du sérum physiologique à chaud. La coloration du pigment varie avec les milieux de cultures, même dans les cultures d'âge différent sur milieu de pommes de terre glycériné de composition identique, le pigment varie entre le vert, le rouge et le brun.

D'après Munch, le pouvoir de former un pigment spécifique n'est pas le même pour tous les bacilles, car la même souche peut changer de couleur au repiquage ou ne plus former de pigment du tout. La constitution chimique du pigment du bacille tuberculeux a été analysée de plus près par Anderson. C'est un dérivé de la naphtaquinone et il a été retiré des substances solubles dans l'acétone.

L'acido-résistance des globulines et albumines labiles.

Il nous a semblé intéressant d'examiner l'acido- et l'alcoolo-résistance des globulines et albumines labiles libres ou liées aux corps lipidiques entraînés avec eux. A cet effet nous avons émulsionné dans l'éther une petite quantité de notre extrait hydrosoluble à analyser

et séché avec prudence à l'abri de la lumière sur une lame recouverte d'une solution glycérine-blanc d'œuf 1/1. Le but de la solution glycérine-blanc d'œuf est de fixer les substances. Puis nous les avons colorées d'après la méthode de Ziehl-Neelsen. Une lame témoin imbibé seulement de la solution glycérine-blanc d'œuf a été colorée par la même technique pour servir de contrôle. Nous avons constaté:

Tableau N° 12.

Recherche de l'affinité des substances acido-alcoolo-résistantes pour les différents constituants protido-lipidiques labiles.

Constituants protido-lipidiques	Présence de substances Ziehl-positives
Extrait en solution physiologique hydrosoluble	++
Globulines	++
Lipides entraînés par les globulines	+
Albumines	—
Lipides entraînés par les albumines	—

Malgré la solidité et l'épaisseur de la cartouche en carton-papier filtre que nous avons employé dans l'appareil de Kumagawa-Suto, de petites quantités de bacilles non hydrolysés ont passé dans le solvant aqueux au cours de l'opération. A l'analyse microscopique ils étaient fortement Ziehl-positifs. Toutefois nous avons pu constater à l'aide de cultures fraîches que le diamètre des bactéries ainsi traitées avait diminué. Nous l'estimons à environ 0,2 μ.

Cette observation prouve que les bactéries acido-résistantes ne sont pas entourées d'une membrane acido-

résistante comme l'affirmait Ehrlich dans sa théorie. Cette opinion était basée sur le fait que les bactéries colorées au bleu de méthylène paraissaient plus minces que celles colorées au Ziehl. Cette observation est d'ailleurs juste. Elle n'est pas due à la grandeur des bactéries, mais plutôt à la diversité des longueurs d'ondes du bleu et du rouge propre à chaque méthode de coloration, phénomène qui trompe l'œil à la mesure de la grandeur des bactéries. Il semble plutôt que chaque corps bactérien acido-alcoolo-résistant est imprégné d'une substance résistante à l'influence de l'alcool et de l'acide. Il est vrai que par extraction à l'eau et avec des solvants organiques, appropriés dans l'appareil de Kumagawa-Suto on peut enlever aux bâtonnets une grande partie des corps gras, il subsiste cependant toujours des bâtonnets acido-résistants qui offrent à ces solvants la même résistance, voire même une résistance plus grande.

Lorsqu'on détruit toute la substance acido-résistante par une extraction plus énergique comme nous allons le prouver dans le chapitre suivant, on produit une lyse des parties albuminoïdes. Le résidu est une masse cellulosique compacte brune, morphologiquement indéfinissable, qui constitue véritablement le squelette des bacilles et qui n'a rien à faire avec l'acido-résistance, puisqu'elle se présente à la coloration de Ziehl-Neelsen comme négative.

A côté de ces corps bactériens nous avons pu prouver, dans l'extrait aqueux, l'existence abondante de masses acido-résistantes morphologiquement indéfinissables. L'hypothèse qu'une partie des composants serait un alcool supérieur (soit le mykol de Tamura ou l'acide dioxycarbonique d'Anderson) n'est pas exclue, quoique des recherches postérieures aient infirmé la découverte de Tamura. Pour isoler cet alcool il faut d'abord le libérer de son éther avec un acide gras supérieur. Il est essentiel de savoir, comme nous l'avons démontré, qu'on peut isoler avec une solution physiologique dans

l'appareil de Kumagawa-Suto des éléments alcoolo- et acido-résistants. Lorsqu'on fait un fractionnement de ces éléments hydrosolubles, les lipides liés aux globulines sont positifs à la méthode de Ziehl-Neelsen.

Chapitre IV.

EXTRACTION DES GLOBULINES ET ALBUMINES STABLES.

Les bactéries, d'abord soumises à une extraction au moyen d'une solution physiologique de chlorure de sodium dans l'appareil de Kumagawa-Suto, et restant dans la cartouche de ce dispositif, sont traitées ensuite pendant 60 h. avec 30 ccm d'une solution alcoolique normale de potasse dans le même dispositif.

L'extrait alcalin ainsi obtenu est de couleur brun foncé et contient une substance liquide huileuse de densité supérieure à la solution alcoolique de potasse. On sèche le tout dans le vide à basse température et on traite le résidu à 3 reprises avec 70 cc d'éther pour récupérer les lipides stables. On pèse exactement ces lipides et on les remet en solution dans l'éther. Puis on filtre et on évapore l'éther.

Après fixation sur des lames au moyen du mélange glycérine-blanc d'œuf on recherche dans le résidu éthéré les éléments acido-alcoolo-résistants. L'examen microscopique montre de très petites parties amorphes peu nombreuses, acido-résistantes, mais relativement bien colorées. Le résidu insoluble dans l'éther et débarrassé des lipides est additionné d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Il se forme immédiatement un précipité blanc qu'on centrifuge au bout de 2 heures. Celui-ci est formé des globulines et des albumines

stables. On les purifie selon la méthode indiquée dans le chapitre précédent, on les pèse et on examine leur acido-résistance.

Il semble intéressant, après l'extraction des globulines et albumines stables et de leurs lipides, de déterminer les acides gras, l'insaponifiable total, l'indice d'iode des acides gras, le cholestérol et l'insaponifiable X qui dans leur ensemble constituent les lipides.

Dosage des acides gras et de l'insaponifiable total.

Pour effectuer ces dosages, nous avons suivi les indications de Lemeland et de Cueni.

Les lipides, après leur dosage exact, sont dissous dans l'éther et transvasés quantitativement dans un ballon de Kjeldahl. On chasse l'éther à l'aide du vide, on y ajoute trente centimètres-cubes de potasse alcoolique normale, et on porte à l'ébullition au bain-marie pendant deux heures au réfrigérant à reflux en ajoutant de petites perles de verre. Après la saponification, on ajoute 28 cm^3 d'eau, on chauffe encore une demi-heure et on laisse refroidir.

La solution alcaline alcoolique est transvasée dans une ampoule à décantation. On rince bien le ballon avec de la potasse alcoolique normale puis avec de l'eau (en tout: 20 ccm) et enfin à l'aide d'éther de pétrole. L'insaponifiable est extrait par une série de trois épuisements (75-90 et 120 ccm) au moyen d'éther de pétrole d'un point d'ébullition de 60°, dans l'ampoule de décantation. Dans sa méthode initiale, Lemeland ajoute après la saponification une proportion d'un mélange d'eau-alcool-acide chlorhydrique normal, le titre de l'alcool étant 50° environ et l'alcalinité de la solution finale égale à une solution de potasse N/10. D'après l'auteur, on chauffe ensuite pendant une demi-heure. Belin a constaté plus tard que l'étalonnage exact de cette solu-

tion est superflu, l'essentiel pour cette technique est la teneur en alcool qui doit être à peu près de 50%. La solution doit simplement être alcaline puisque dans ces conditions la séparation par agitation au moyen de l'éther de pétrole s'effectue plus facilement. Nous avons pour cette raison abandonné l'addition d'alcool et d'acide chlorhydrique. Après la saponification, nous avons simplement dilué la solution alcoolique au moyen d'eau distillée pour ramener au titre alcoolique nécessaire.

La manipulation de l'épuisement de l'insaponifiable doit être effectuée avec beaucoup de soins pour obtenir une séparation nette des deux couches de solvant. Pour chaque manipulation, on agite pendant environ dix minutes, puis on laisse reposer jusqu'à ce que la couche inférieure soit devenue complètement limpide.

On sépare complètement les deux liquides. On recueille dans une même ampoule les solutions éthérées qu'on lave à l'eau distillée légèrement alcaline. On retient ainsi les traces de la solution alcoolique renfermant les acides gras qui auraient pu être entraînés au cours de la manipulation.

La solution éthérée ainsi lavée est ensuite évaporée dans le vide. On reprend avec de l'éther de pétrole sec, on filtre et on laisse déposer les impuretés pendant deux heures. On reprend et on filtre à nouveau dans un becher taré, on évapore, on sèche dans le vide et on pèse jusqu'à poids constant. Le poids trouvé correspond à l'insaponifiable total.

D'après les indications de Lemeland et de Belin, on doit sécher l'insaponifiable après évaporation de l'éther de pétrole pendant trois heures à une température ordinaire dans le vide, pour éviter une perte de poids.

Puis la solution hydroalcoolique est acidifiée par de l'acide clorhydrique pur; on amène le volume à 150 ccm au moyen de l'eau afin d'abaisser le titre de l'alcool à 25° environ, et on extrait quatre fois avec 80 ccm d'éther de pétrole distillé à 60°. Les extraits sont réunis dans

une ampoule à décantation et lavés deux fois avec 80 ccm d'eau pour enlever l'acide entraîné. On transvase la solution éthérée dans un ballon, on évapore à sec dans le vide. On reprend par l'éther de pétrole sec; on laisse déposer les impuretés pendant quelques heures, on filtre dans un ballon taré bouché à l'émeri, on évapore et on sèche dans le vide jusqu'à poids constant pour obtenir les acides gras. Belin sèche aussi les acides gras pendant trois heures dans le vide à une température de 50°. Tamura a démontré que le poids moléculaire des acides gras augmente par oxydation si on les conserve à l'air et à la lumière sous l'influence d'une température élevée. En effet, même en remplaçant la dessiccation à 50° par celle à température ordinaire et dans le vide comme pour l'insaponifiable, Cueni a souvent constaté une augmentation de poids des acides gras.

Détermination de l'indice d'iode des acides gras.

Pour la détermination de l'indice d'iode, nous avons employé la méthode de Hubl.

Les acides gras, obtenus après leur dosage exact, sont dissous dans 5 ccm de chloroforme. Dans un autre ballon bouché à l'émeri (servant de témoin) on met simplement 5 ccm de chloroforme. Puis on verse exactement dans chaque flacon 5 ccm d'une solution de 60 gr. d'iode par litre d'alcool à 95° et 2 ccm d'une solution alcoolique de bichlorure de mercure à 6%. On bouche, on agite et on abandonne au repos dans l'obscurité pendant 2 heures. Au bout de ce temps, on ajoute dans chacun des deux flacons 5 ccm d'une solution aqueuse d'iodure de potassium à 15%. On agite vivement pendant une ou deux minutes et on verse dans chaque flacon, en rinçant les parois, 10 ccm d'eau, puis du thiosulfate de sodium N/10 jusqu'à disparition presque totale de la teinte jaune due à l'iode. On ajoute 2 ccm d'une solution d'amidon qui colore la masse en bleu, puis de nou-

veau et lentement, du thiosulfate de sodium N/10 jusqu'à disparition complète de la teinte bleue. Soit T le nombre de ccm nécessaires pour enlever l'iode non utilisé du témoin; T' le nombre de ccm pour le dosage définitif, on a:

$$\frac{100\ (T—T') \times 0{,}01269}{\text{poids d'acides gras en gr.}} =$$

Poids d'iode qui peut être fixé sur 100 gr. d'acides gras.

Dosage du cholestérol total, Calcul de l'insaponifiable X.

Pour le dosage du cholestérol, nous nous sommes adressés à la méthode de Windaus, en observant les modifications apportées par Caminade. Cueni a signalé que l'ancienne méthode est équivalente à celle de Caminade.

Après avoir pesé exactement l'insaponifiable total dans un becher on le reprend par 20 ccm d'un mélange eau-alcool-acétone, préparé d'après la formule suivante:

Acétone	73	parties
eau distillée	18	»
alcool absolu	9	»

On porte à l'ébullition, on chauffe modérément de façon à bien dissoudre le résidu. On retire du feu et on ajoute immédiatement à 5 ccm d'une solution de digitonine à 0,5% dans le solvant. Le complexe digitonine-cholestérol précipite tout de suite. On laisse déposer quelques minutes, puis on filtre sur un filtre préalablement séché et taré. On lave le becher avec de l'eau bouillante, on rince le filtre plusieurs fois avec un jet d'eau bouillante. On laisse égoutter l'entonnoir, puis on le remplit avec le solvant, ceci pour faciliter le lavage ultérieur à l'éther. Lorsque le filtre est de nouveau

égoutté, on le lave plusieurs fois au moyen d'éther. On met enfin le filtre dans un pèse-filtre et on porte le tout à l'étuve à 100—110°. On retire au bout d'une heure et on pèse.

Le poids trouvé multiplié par 0,2431 donne le poids de cholestérol correspondant.

L'insaponifiable X est ensuite calculé par différence entre l'insaponifiable total et le cholestérol.

Le tabeau suivant montre les résultats obtenus de l'analyse:

Tableau N° 13.

Teneur du Grasbacillus en Globulines et Albumines stables.

	Analyse N° 1	Analyse N° 2	Moyenne %	
Bacilles secs	6.4720	5.1952	5.8368	
Extract. KOH alcool.	1,5097	1,4605	1,4851	25,6
Globulines et Albumines	0,0498	0,0474	0,0486	0,83
Lipides des Globulines et Albumines	0,0040	0,0030	0,0035	0,05
Acides gras libres .	0,6084	0,5860	0,5972	10,2
Insaponifiable total	0,8937	0,7527	0,8232	14,0
Cholestérol	0,0180	0,0072	0,0126	0,21
Insaponifiable X. ..	0,8757	0,7455	0,8106	13,8
Indice d'iode	34,6	34,2	34,4	

Il serait intéressant d'analyser de plus près les globulines et albumines stables ainsi que les globulines et albumines hydrosolubles (labiles) et leurs lipides. En particulier, la détermination en acides gras et choles-

térol expliquerait sans doute le faible pourcentage de lipides par rapport aux albumines et pour lequel Lobstein donne des chiffres plus élevés dans ses analyses sur le bacille tuberculeux.

La trop petite quantité de lipides n'a pas permis ces essais. Ils seront repris plus tard avec un matériel plus important.

Tableau N° 14.

Teneur du bacille en matières grasses suivant les différents modes opératoires.

	Bacille de Koch An Lobstein	Grasbacillus	
		Analyse Georgescu	Analyse Kreyenbühl
Poids des bacilles secs ..	0,7930	1,1490	5,8368
Acides gras	0,1775	0,2212	0,5970
Insaponifiable total	0,0780	0,1287	0,8232
Cholestérol	0,0036	0,0109	0,0126
Insaponifiable X.	0,0744	0,1178	0,8106
Indice d'iode	20,02	19,02	34,4
Point de fusion	46,0	40,2	—
Acides gras % d. bac. secs	22,4	19,25	10,22
Insaponifiable % des bac. secs	9,87	11,2	14,0
Cholestérol % d. bac. secs	0,46	0,95	0,21
Extrait alcoolique	0,281	—	1,4851
Extrait aqueux	—	—	1,5470
Extrait alcoolique % des bacilles secs	35,5	—	25,6
Extrait aqueux % des bacilles secs	—	—	26,6

L'analyse microscopique de la partie extrait à la potasse alcoolique a fourni des résultats surprenants. Alors que les globulines et albumines montrent de petits

éléments fortement Ziehl-positifs, leurs lipides n'en ont pas ou en ont en très petites quantités; dans les acides gras par contre, il n'y avait pas d'éléments acido-résistants. Des essais avec l'insaponifiable et le cholestérol furent également négatifs.

Contrairement aux opinions de R. Koch et des recherches plus récentes, l'acido-alcoolo-résistance n'est pas due uniquement aux acides gras. A notre avis, elle est due à une combinaison des acides gras avec un élément partiellement hydrosoluble. Si le résidu de l'extraction par la solution physiologique et par la potasse alcoolique n'est pas entièrement colorable à la méthode de Ziehl, la structure cellulosique et protéidique indépendante de l'acido-résistance, l'explique sans peine. Il est à remarquer cependant qu'en partant d'un poids initial de 5,83 gr., deux extractions, l'une aqueuse et l'autre alcoolique, laissent un résidu insoluble de 3 gr., ce qui correspond à 53%. On ne peut admettre que ce résidu élevé soit formé uniquement de substance de soutien, il faut plutôt croire que l'extraction n'avait pas été complète.

C'est pour cette raison que nous avons été amené à modifier notre technique comme elle sera expliquée dans les chapitres suivants.

Chapitre V.

DETERMINATION DES GLOBULINES ET DES ALBUMINES PAR MACERATION.

Après un développement de dix jours à 37°, sur un milieu de J. Meyer, dont nous avons donné la composition plus haut, les bacilles sont recueillies sur un filtre exempt de matières grasses et lavés au moyen d'eau distillée.

La masse bactérienne est desséchée à basse pression et à température constante dans l'appareil précédemment décrit. L'opération est interrompue à plusieurs reprises, pour permettre de dissocier les cultures dans un mortier de porcelaine. Ce mode opératoire présente l'avantage de déshydrater les bacilles sans porter atteinte à leur composition chimique et à leur structure moléculaire (phénomène d'oxydation et de réduction). Les bacilles soigneusement desséchés et pesés sont placés dans une fiole plate à parois épaisses contenant des billes de verre. On les fait macérer dans 200 gr. d'une solution demi-saturée et neutre de sulfate d'ammonium. Cette macération dure cinq mois dans l'analyse N° 1; deux mois dans l'analyse N° 2, on opère alternativement dans l'étuve à 37° et dans l'agitateur mécanique.

Séparation des fractions A, B, C et D.

Comme nos essais préliminaires nous l'avaient prouvé, il est impossible d'autolyser entièrement les

bactéries au moyen d'une solution saturée ou demi-saturée de sulfate d'ammonium, même après une macération de six mois.

Le produit de cette macération est porté sur un filtre sans graisse et le résidu est lavé à l'aide d'une solution demi-saturée de sulfate d'ammonium. D'après Machebœuf les globulines précipitent, tandis que les albumines restent en solution. Le filtrat contient à la fois les albumines des corps bactériens et les hydrates de carbone, les acides aminés etc. Le résidu est formé d'un grand nombre de bactéries non autolysées et des globulines précipitées par le sulfate d'ammonium.

Dans le filtrat (fraction A) nous précipitons les albumines en saturant le filtrat à l'aide de sulfate d'ammonium cristallisé. Nous centrifugeons la solution précipitée, une partie des albumines se rassemble au fond du verre à centrifugation, une autre partie reste en suspension. Par des centrifugations répétées et par un séjour à la glacière, toutes les albumines sont précipitées. Nous éliminons le liquide surnageant, contenant les acides aminés hydrosolubles, les hydrates de carbone etc.

Cette opération permet une séparation presque totale des albumines ainsi que des lipides correspondants, de la solution mère (fraction C). Des données plus précises sur la concentration en ions H des solutions utilisées se trouvent à la page 41. Les albumines ainsi obtenues sont dissoutes dans une faible quantité d'eau (pH 7) en vue des déterminations ultérieures selon la méthode donnée plus haut. Nous déterminerons quantitativement les éléments constituant les albumines: les lipides, les acides gras ainsi que l'indice d'iode, l'insaponifiable, le cholésterol et l'insaponifiable X.

Le résidu (fraction B) contient les globulines précipitées par la macération et une certaine quantité de bâtonnets non autolysés ainsi que des traces de sulfate

d'ammonium non dissous. Les globulines étant solubles dans l'eau, le résidu est lavé à l'eau distillée jusqu'à disparition complète du sulfate d'ammonium. Son absence est contrôlée au moyen d'une solution de chlorure de baryum N/10. Les eaux de lavages sont rejetées et le résidu est traité dans un flacon Erlenmeyer avec 10 gr. d'eau distillée froide. Cette opération se répète 8—10 fois et l'eau est décantée chaque fois aussi complètement que possible.

Ce mode opératoire permet une dissolution intégrale des globulines précipitées. Les produits des différentes macérations sont évaporés dans le vide à 15—18° jusqu'au poids de 50 gr. environ. Cette solution (fraction D) est additionnée jusqu'à demi-saturation de sulfate d'ammonium cristallisé, puis elle est agitée pendant quelques minutes. On laisse déposer les globulines précipitées, on centrifuge et on élimine le liquide surnageant. Les globulines hydrosolubles sont mises en solutions dans une très petite quantité d'eau. On les précipite de nouveau et on centrifuge. Ce dépôt est coagulé par de l'alcool bouillant et épuisé au moyen d'alcool-éther dans l'appareil de Kumagawa-Suto. Cette technique est décrite avec de plus amples détails aux pages 42 et suivantes.

L'analyse totale porte sur les globulines, les lipides, les acides gras ainsi que l'indice d'iode, l'insaponifiable, le cholestérol, l'insaponifiable X. Les résultats quantitatifs sont donnés plus loin.

Séparation des fractions E, F, K et L.

Le résidu des bactéries non autolysées par la macération (fraction E) est déshydraté dans le vide et épuisé à trois reprises à l'aide de 100 gr. d'acétone rectifiée. L'acétone dissout les lipides libres, les graisses neutres et les acides gras (v. Machebœuf) ainsi que les globulines correspondantes.

L'acétone est évaporée à la température de +10° dans le vide jusqu'à apparition d'un précipité blanc. La solution trouble est alors additionnée d'un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Après un séjour de 3—4 jours à l'obscurité et après agitations répétées dans un flacon bien fermé, un précipité jaunâtre apparaît à la zône de séparation des deux liquides. Ce précipité est séparé par décantations et centrifugations répétées. Comme une expérience de contrôle avec des globulines de sérum de cheval nous l'a montré, ce précipité (fraction K) est constitué par des globulines et des lipides qui y sont liés. Ce dernier est repris par un peu d'acétone et précipité à nouveau en solution demi-saturée de sulfate d'ammonium. On centrifuge, on ajoute la solution acétone-sulfate d'ammonium à la solution acétonique primitive. Les globulines sont coagulées par de l'alcool bouillant; les lipides sont séparés des protéides par une extraction dans l'appareil de Kumagawa-Suto au moyen d'alcool et d'éther.

Les analyses quantitatives permettent la détermination exacte des composants suivants: globulines, lipides liés aux globulines, acides gras ainsi que leur indice d'iode, insaponifiable, cholestérol et insaponifiable X.

La partie soluble (fraction L) dans l'acétone est évaporée jusqu'à siccité à la température constante de 35°. On dissout à nouveau le résidu dans l'acétone pure puis on évapore le solvant. Le résidu contient encore d'importantes proportions de sulfate d'ammonium. Pour l'éliminer, on dissout à plusieurs reprises dans de l'éther anhydre et on filtre sur filtre desséché et dégraissé. Grâce à ce procédé, le sulfate d'ammonium reste sur le filtre et la solution éthérée ainsi obtenue à l'état de pureté est évaporée dans le vide à la température de 15—18° jusqu'à poids constant.

Parmi les lipides libres ainsi obtenus, on dose les acides gras, leur indice d'iode, l'insaponifiable, le cholestérol, et l'insaponifiable X.

Un traitement de ces lipides par l'alcool bouillant montre l'absence de tout protéide. La solution (fraction L) provenant de la fraction F (voir schéma du mode opératoire) ne contient par conséquent que des lipides libres.

Détermination des fractions G, H et I.

Le résidu de la fraction E (fraction G) est traité à cinq reprises par 100 gr. de chloroforme. La solution (fraction I) obtenue est évaporée dans le vide à la température ordinaire et l'extrait sec de la partie soluble dans le chloroforme est pesé.

Dans ce résidu on détermine à nouveau les acides gras, l'indice d'iode, l'insaponifiable, le cholestérol, et l'insaponifiable X.

Les protéides n'ont pu être décelés. Comme dans la fraction F, le chloroforme ne dissout aucun protéide du corps bactérien. La partie insoluble dans le chloroforme (fraction H) est une masse amorphe de couleur blanc-jaunâtre, insoluble dans l'eau bouillante, dans la potasse alcoolique, partiellement soluble dans l'éther, entièrement soluble dans l'acide sulfurique dilué. La réaction xantho-protéique de Mulder se révèle positive. Il s'en suit que la partie insoluble est de nature protidique.

Pour la technique détaillée de la détermination des lipides, des acides gras, de l'insaponifiable, et du cholestérol nous renvoyons à la page 43 et 50.

Dans les tableaux qui suivent, nous donnons les résultats quantitatifs des deux analyses, ainsi que leur pourcentage.

Tableau N° 15.

Albumines hydrosolubles (fraction C).

	Analyse N° 1	%	Analyse N° 2	%
Poids du matériel à analyser	8,3330		10,5934	
Albumines débarassées des lipides ..	0,0453	0,54	0,0073	0,07
Lipides entraînés p. les albumines ...	0,1636	1,96	0,0361	0,34
Acides gras	0,1528	1,83	0,0379	0,35
Insaponifiable total	0,1416	1,69	0,0508	0,47
Cholestérol	0,0026	0,03	0,0030	0,02
Insaponifiable X. ..	0,1339	1,66	0,0478	0,45
Indice d'iode des acides gras	13,4		13,4	

La récolte des albumines hydrosolubles dépend du temps de macération de la culture bactérienne. La macération de l'analyse N° 1 ayant duré cinq mois, celle de l'analyse N° 2 seulement deux mois, la différence des poids obtenus est évidente. Le taux de cholestérol dans ces deux analyses est plus élevé par rapport aux autres fractions. Le faible indice d'iode indique la présence d'une proportion notable d'acides gras saturés.

Tableau N° 16.

Globulines hydrosolubles (fraction D)

	Analyse N° 1	%	Analyse N° 2	%
Poids du matériel à analyser	8,3330		10,5934	
Globulines débarrassés des lipides ...	0,0170	0,20	0,0159	0,16
Lipides entraînés p. les globulines ...	0,0245	0,29	00,0211	0,19
Acides gras	0,0152	0,18	0,0128	0,12
Insaponifiable total	0,0201	0,24	0,0170	0,16
Cholestérol	0,0031	0,03	0,0025	0,02
Insaponifiable X. ..	0,0198	0,21	0,0145	0,14
Indice d'iode	34,8		33,2	

Les résultats obtenus dans les deux analyses sont sensiblement identiques. La faible proportion des globulines hydrosolubles prouve que toute les globulines n'ont pas pu être identifiées par la macération.

Tableau N° 17.

Partie soluble dans l'acétone (lipides libres) (fraction L).

	Analyse N° 1	%	Analyse N° 2	%
Poids du matériel à analyser	8,3330		10,5934	
Lipides libres	0,2124	2,54	0,6048	5,71
Acides gras entraînés par les lipides libres	0,1514	1,81	0,4229	3,99
Insaponifiable total	0,0606	0,72	0,1684	1,59
Cholestérol	0,0025	0,02	0,0046	0,04
Insaponifiable X. ..	0,0581	0,69	0,1638	1,56
Indice d'iode des acides gras	41,1		47,4	

La valeur importante de l'indice d'iode s'explique par la nature du fractionnement. En effet l'acétone pure dissout principalement les acides gras non saturés.

Tableau N° 18.

Globulines solubles dans l'acétone (fraction K).

	Analyse N° 1	%	Analyse N° 2	%
Poids du matériel à analyser	8,3330		10,5934	
Globulines débarrassés des lipides ...	0,0666	0,79	0,0123	0,11
Lipides entraînés p. les globulines ...	0,2220	2,67	0,5353	5,05
Acides gras entraînés par les globul.	0,2731	3,27	0,5787	5,46
Insaponifiable total	0,0373	0,44	0,2521	2,38
Cholestérol	0,0014	0,01	0,0051	0,04
Insaponifiable X. ..	0,0359	0,43	0,2470	2,33
Indice d'iode	32,5		32,9	

Les rapports globulines et acides gras des globulines

$$\frac{\text{lipides}}{\text{insaponifiable}}$$

du tableau N° 16 et du tableau N° 18 sont différents. On est amené à supposer que les fractions D et F sont de nature chimique différente et que par conséquent elles ont une action biologique dissemblable.

Tableau N° 19.

Partie soluble dans le chloroforme (fraction J).

	Analyse N° 1	%	Analyse N° 2	%
Poids du matériel à analyser	8,3330		10,5931	
Lipides libres	0,1664	2,00	0,3443	3,25
Acides gras	0,0786	0,94	0,0356	0,33
Insaponifiable total	0,0878	1,05	0,3184	3,00
Cholestérol	0,0034	0,04	0,0097	0,091
Insaponifiable X. ..	0,0844	1,01	0,3087	2,91
Indice d'iode	30,7		35,4	

D'après l'école américaine (Anderson) la partie soluble dans le chloroforme (fraction J) contiendrait de la cire. Notre analyse semble démontrer que le chloroforme dissout non seulement cette substance mais encore des acides gras libres. Le taux de cholestérol est relativement élevé.

Tabeaux N° 20.

Tableau récapitulatif des résultats obtenus au cours des analyses.

	Analyse N° 1	%	Analyse N° 2	%
Protéides totaux ...	0,1289	1,54	0,0355	0,33
Acides gras totaux .	0,6711	8,05	1,0879	10,36
Cholestérol total ...	0,0130	0,15	0,0243	0,23
Insaponifiable total	0,3474	4,17	0,8067	7,61
Lipides totaux	0,7889	10,0	1,5416	14,56
Partie insoluble ...	3,7649	45,3	4,3174	40,7
Insaponifiable X. tot.	0,3344	4,01	0,7824	7,38
Moyenne de l'indice d'iode	30,5		32,5	

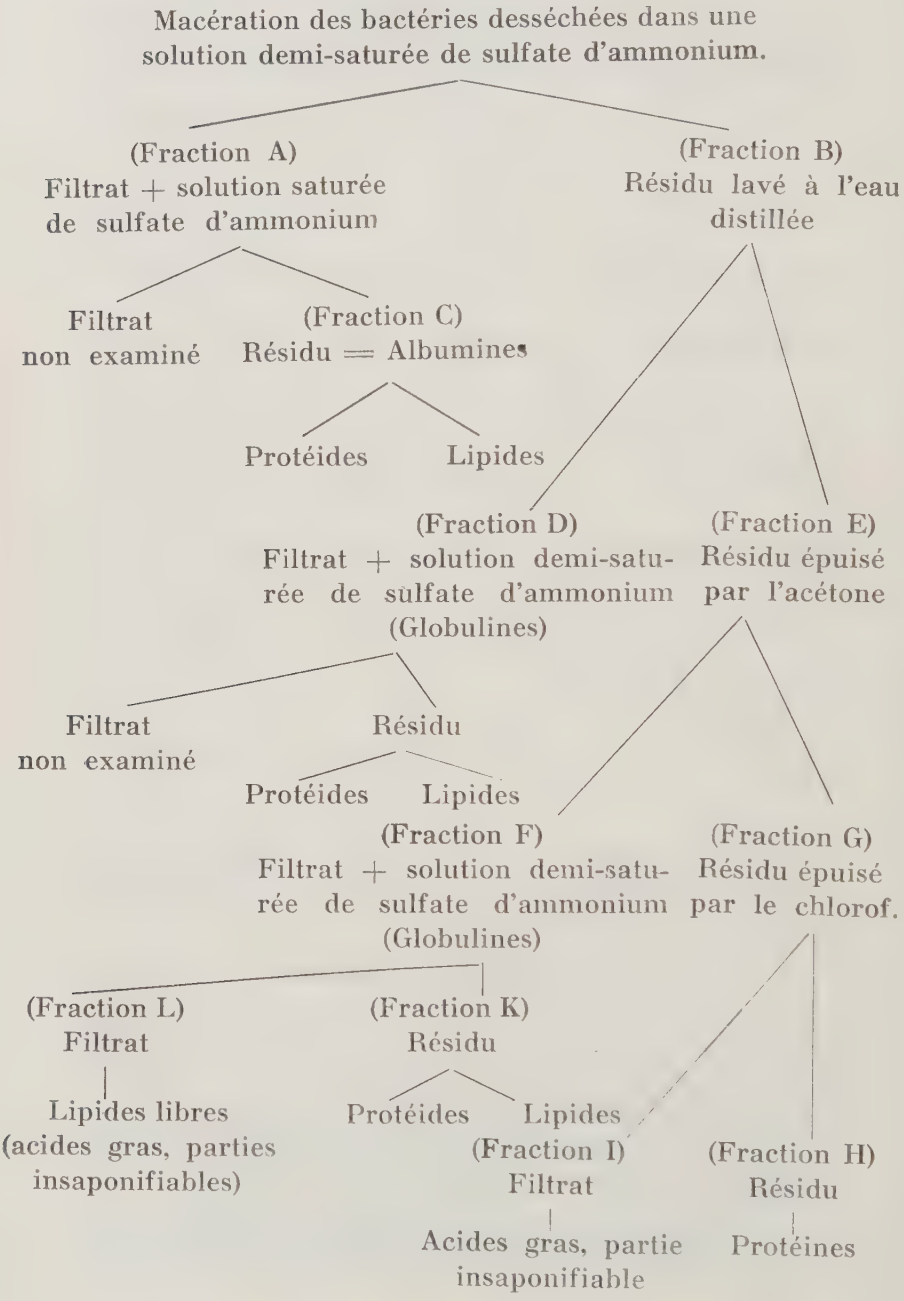
Dans ce tableau nous indiquons l'addition et les proportions des différents éléments que nous avons pu isoler au cours de nos analyses.

Le taux des éléments isolés (acides gras, cholestérol, insaponifiable total) ne correspond pas aux résultats publiés par Lobstein pour le bacille tuberculeux. En particulier les chiffres des acides gras sont plus petits que ceux, obtenus par Lobstein, mais la composition du milieu de culture et l'âge de la souche à examiner modifient toujours la composition du bacille.

Le tableau suivant montre le schéma du mode opératoire de l'analyse avec les fractionnements successifs:

Tableau N° 21.

Schéma de l'analyse d'après le procédé de macération.



Chapitre VI.

EXAMEN MICROSCOPIQUE DES PRODUITS DE FRACTIONNEMENT.

Technique.

La substance à examiner est posée sur une lame dégraissée et on en fait un frottis aussi mince que possible au moyen d'une goutte d'eau distillée stérile ou d'un mélange fixateur glycérine-blanc d'œuf à parties égales. On laisse sécher les frottis à l'abri de la lumière et de la chaleur pour éviter une oxydation des matières grasses. Les acides gras libres à examiner, ainsi que les lipides, sont dissous dans l'alcool-éther (1:1) et cette solution est placée sur la lame porte-objet. Ce mélange permet également une fixation des matières grasses (Lobstein).

Nous avons utilisé pour la coloration la fuchsine de Ziehl dont la formule est la suivante:

Fuchsine	1 gr.
Alcool 95°	10 cc.
Phénole cristallisé	5 gr.
Aqua dest. ad.	100 gr.

Nous recouvrons entièrement la lame de cette solution et nous chauffons jusqu'à émission franche de vapeur. Cette opération est répétée trois fois. Puis nous lavons la lame à grande eau et nous l'immergeons pendant dix minutes dans l'acide nitrique au 1/3. Nous lavons à nouveau et traitons la préparation pendant dix minutes à l'alcool à 95°. Enfin nous contrecolorons pen-

dant deux minutes avec une solution aqueuse de bleu méthylène; nous lavons et séchons.

Examen microscopique.

Après une macération de trois mois à l'étuve à 37° dans une solution mi-saturée de sulfate d'ammonium, les bacilles sont filtrés. Le résidu est lavé à trois reprises au moyen de l'eau distillée stérile et examiné au microscope: Nous remarquons de nombreux bâtonnets granuleux à propriété acido-alcoolo-résistante. A côté nous trouvons des amas sans structure définie qui se colorent par la méthode de Ziehl ainsi que des formes non granuleuses qui sont Ziehl-négatives.

Le résidu (fraction E) est additionné d'acétone qui dissout les globulines, les lipides qui y sont liés et les lipides libres. On examine la partie insoluble dans l'acétone. Examen microscopique: Les bâtonnets observés sont pour la plupart Ziehl-négatifs. Les formes granuleuses résistent également à la coloration de Ziehl. En outre on retrouve les mêmes masses amorphes Ziehl-positives.

Le résidu est solubilisé dans du chloroforme et le filtrat est examiné au microscope (fraction I).

A l'examen on observe environ 20% de bâtonnets granuleux Ziehl-positifs et le reste, formé par des amas amorphes est pour la plupart Ziehl-positif.

La partie insoluble dans le chloroforme est entièrement dépourvue d'acido-résistance. Nous avons très rarement observé des bactéries intactes (fraction H).

Le filtrat acétonique de la fraction E (fraction F) est à demi-saturé de sulfate d'ammonium. Le précipité (fraction K) ainsi formé présente l'aspect microscopique suivant:

Il y a absence complète de bactéries. Les éléments sans structure définie sont Ziehl-négatifs.

Le filtrat de la première macération (fraction A) est additionné d'une solution saturée de sulfate

d'ammonium. Le précipité (fraction C) présente l'aspect suivant:

Absence complète des bâtonnets Ziehl-positifs et Ziehl-négatifs. A un premier examen tout le champ microscopique est parsemé d'éléments cocciformes Ziehl-négatifs et Gram-positifs. Ces formes constituent une impureté de la fraction A. En effet, les albumines semblent constituer un excellent milieu de culture pour les autres bactéries. Par la suite les fractions utilisées ont toujours été additionnées de Vuzine pour éviter toute souillure par d'autres microorganismes. Des frottis purs ont montré l'absence complète d'éléments acido-alcoolo-résistants.

Le résidu de la macération aqueuse primitive est lavé à l'eau stérile (fraction D). L'eau de lavage est additionnée d'une solution de sulfate d'ammonium jusqu'à demi-saturation et le précipité est porté sous le microscope.

On n'y trouve aucune forme typique de Grasbacillus, les bâtonnets ont l'aspect de formes d'involution présentant de grandes vacuoles ou de simples squelettes bactériens. Des bâtonnets acido-alcoolo-résistants n'ont pas pu être décelés. On observe à plusieurs endroits des granulations Ziehl-positives, peu visibles à des amas amorphes, résistant à la décoloration à l'aide d'alcool et d'acide.

La fraction F est additionnée de sulfate d'ammonium et le filtrat sert à l'examen microscopique:

Nous observons presque uniquement des éléments Ziehl-négatifs. A côté se trouvent quelques rares amas amorphes à propriété Ziehl-positive.

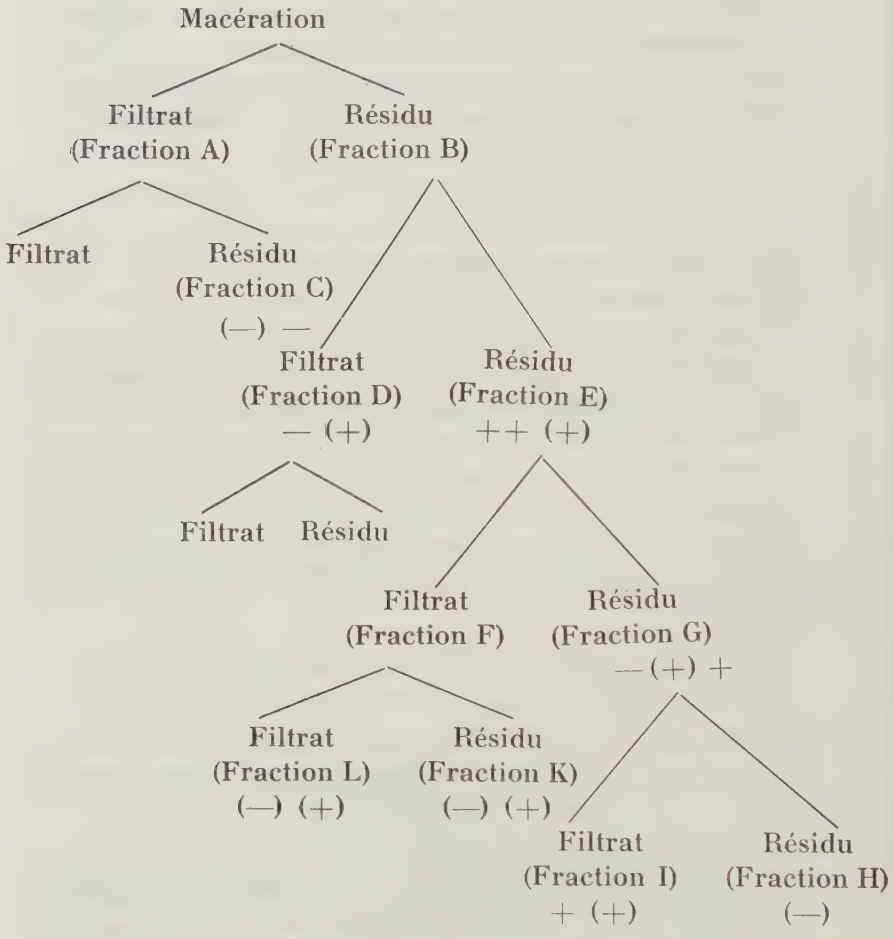
L'insaponifiable de la partie soluble dans le chloroforme (fraction I) est acido-alcoolo-résistant. La masse à examiner est entièrement amorphe, de même la partie insaponifiable de la fraction H est Ziehl-positive.

L'examen microscopique des globulines et des albumines, débarrassées des lipides qui y sont liées, a donné les résultats suivants:

Les protéides purs sont Ziehl-négatifs. Si dans les frottis nous avons trouvé des bâtonnets ou des masses amorphes acidorésistants, cela est dû soit à des impuretés, soit à une séparation incomplète.

Tableau N° 22 (voir Tableau N° 21).

L'acido-alcoolo-résistance des différents fractionnements.



+ + bâtonnets Ziehl-positifs.

— — bâtonnets Ziehl-négatifs.

(+) (+) amas amorphes Ziehl-positifs.

(—) (—) amas amorphes Ziehl-négatifs.

CONCLUSIONS.

A. Séparation des Albumines et Globulines labiles

1. L'autolyse complète du Grasbacillus n'est possible ni dans l'eau distillée, ni dans le sérum physiologique, même après une macération de longue durée.

2. L'autolyse à température ordinaire ou à température élevée par des acides dilués, des alcalis, le trichloréthylène, (Aronson) la neurine, (Much) l'eau oxygénée suivie d'une pression de trois atmosphères, modifie la constitution chimique du corps bactérien de manière à déséquilibrer le métabolisme protéides/lipides.

3. La macération de la culture bactérienne dans une solution isotonique de chlorure de sodium provoque une autolyse partielle.

4. Dans sa solution résultant de cette macération on peut partiellement précipiter des globulines et des albumines liées aux lipides.

5. Les éléments hydrosolubles semblent correspondre partiellement à l'antigène complet de certains germes pathogènes (Mesrobeanu). Ce sont des substances insolubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme. Elles sont constituées par la liaison d'un polysaccharide et d'un lipide. On y trouve également des substances protéidiques.

6. L'acido-résistance du bacille étudié ne doit être imputée ni aux albumines labiles ni aux lipides qui y sont liés.

7. Les globulines labiles, au contraire, ainsi que les lipides qui y sont liés sont acido-alcoolo-résistants. Les lipides et les matières protidiques, qui par leur union constituent les globulines acido-résistantes, ne sont à eux seuls nullement Ziehl-positifs.

8. La partie hydrosoluble du Grasbacillus est de 26,6%. Les albumines et les globulines représentent 2,5%. Le reste est constitué par des acides aminés, des hydrates de carbone, des polysaccharides.

9. Le pigment du Grasbacillus est partiellement lié aux lipides des globulines labiles. On peut le séparer des lipides au moyen d'un épuisement par le chloroforme. La couleur du pigment varie suivant les différents milieux de cultures d'une même souche.

B. *Séparation des globulines et albumines stables.*

1. Une dissolution complète des bactéries dans l'appareil de Kumagawa-Suto au moyen de la potasse alcoolique n'est pas possible, même après un temps assez long.

2. Le résidu insoluble n'est pas constitué uniquement de substances de soutien (cellulose et chitine); on y trouve encore les substances grasses et cireuses.

3. L'action des alcalis ne détruit pas entièrement les liaisons globulines et albumines.

lipides lipides

4. Le produit de l'épuisement par la potasse alcoolique contient de rares éléments fortement Ziehl-positifs. Ces derniers sont également décelables dans les globulines. Les acides gras correspondants, au contraire ne sont pas acido-résistants.

5. Nous sommes donc en droit de supposer que, contrairement à l'avis de R. Koch et d'autres chercheurs, l'acido-résistance n'est pas liée aux acides gras seuls. Cette propriété semblerait due à la liaison de ces acides gras avec d'autres substances de nature protidique.

C. *Séparation des albumines et globulines par le procédé de la macération.*

1. L'autolyse totale des bâtonnets acido-résistants au moyen d'une macération assez prolongée dans une solution de sulfate d'ammonium est impossible.

2. La récolte des albumines et globulines dépend de l'âge des cultures utilisées et du temps de la macération. Il est par suite impossible, dans deux analyses différentes, d'aboutir aux mêmes valeurs proportiennelles.

3. Notre technique permet la séparatian de deux fractions de globulines qui diffèrent par leur composition chimique.

4. L'étude des propriétés tinctoriales par la méthode de Ziehl-Neelsen des différents fractionnements nous permet d'affirmer que (voir Tableau N° 21):

   a) la fraction C (albumines) est entièrement Ziehl-négative. Ce résultat confirme d'ailleurs les observations des examens précédents, ceux-ci nous ont permis de démontrer que l'acido-alcoolo-résistance n'est nullement en rapport avec les albumines.

   b) les globulines au contraire et les lipides liés à leur molécule présentent en partie la propriété de résister à l'action des acides et de l'alcool. L'acido-résistance n'est donc pas tributaire des lipides des globulines, mais constitue une propriété inhérente aux globulines totales.

c) Ces éléments acido-résistants sont en majeure partie contenus dans la fraction soluble dans l'acétone.

d) Le résidu insoluble est constitué principalement par des protides et des substances de soutien. Cette fraction n'est pas acido-résistante.

BIBLIOGRAPHIE.

ANDERSON R. J. — Ueber die Zusammensetzung des gesamten extrahierbaren Fettes der Tuberkelbazillen. — Z. f. phys. Chemie, 191, 1930.

— Ueber das Vorkommen einer unges. Hexakonsäure im Fett der Tuberkelbazillen. — Z. f. phys. Chemie 191, 1930.

ANDERSON u. MITARBEITER. — The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli. J. biol. Chemie 74, 525, 537; 83, 169, 505; 84, 703; 85, 77, 327, 339, 351, 509, 519, 529; 87, XVII; 89, 599, 611, 619; 90, 33, 45; 92, XXXII; 94, 451, 465, 653; 97, 617, 639; 98, 43, 101, 105, 499, 773; 103, 197, 405. Amer. Rev. Tbc. 24, 746; Physiol. Rev. 12, 166. — Z. f. phys. Chemie 191, 157, 166, 172; 211, 97, 103.

ANDERSON R. J. — A discussion of certain fat constituents of acid fast bacteria. — Amer. Rev. Tbc. 24, 746-750.

— A study of the lipoids of tubercle bacilli. — Trans. Nat. Tbc. Assoc. 240.

ARONSON H. — Zur Biologie der Tuberkelbazillen. — Berlin. Klin. Wochenschrift Nr. 35, p. 1617.

BECK M. — Zur Frage der säurefesten Bakterien. — Tuberkulose-Arbeiten, Heft 3, p. 145.

BELIN P. — Généralité de la distinction entre deux catégories de la matière grasse: élément constant et élément variable. — Bull. soc. chimie biol. 1926, 8, p. 1081.

BOER H. D. — Activation de la forme filtrable du bacillus tbc. par l'extrait acétonique du bacille de Koch. — C. r. Soc. Biol. 117, 772.

BRUNNER D. — Influance nutritive condition and acid fastness of bacteria. — I. inf. Diss. 55, 26-38.

BRISCONI M. — The decomposition of tubercle-protein starch and gelatin by dry grinding. — Amer. Rev. Tbc. 31, 542-546.

BURT M. R. — The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli XXIV. Analysis of the acetone-soluble fat of the bodine tubercle bacillus. — J. of biol. Chemie 94, 451-463.

COGHILL R. — A proximate chemical analysis of the timothy bacillus. — J. of biol. Chemie 81. 115.

— The chemistry of timothy bacillus. — J. of biol. Chemie 54. 721. cfr. J. of biol. Chemie 70, 439; 54, 721.

CAMINADE M. R. — Sur quelques modifications apportées au dosage de la cholestérine par la méthode de Windaus. — Bull. soc. chim. biol. 4, p. 601, 1922.

CHARGAFF E. — Separation of the lipoid fraction from the timothy bacillus. — J. of biol. Chemie 90. 45-55.

— The chemistry of the lipoids of tubercle bacillus XXIII. Separation of the lipoid fraction from the timothy bacillus. J. of biol. Chemie 90, 45-55.

— Zur Chemie der Bakterien. II. Mitt. Ueber die Lipoidverteilung in säurefesten Bakterien. — Hoppe Seyl. Z. 201. 198-207.

— Zur Chemie der Bakterien. Ueber den Lipoidgehalt verschiedener Tuberkelbazillen. Biochem. Z. 255, 319-329.

— Neue Arbeiten über die chem. und biol. Eigenschaften der einzelnen Fraktionen der Tuberkelbazillen. Z. Tbk. 61, 142-148.

— Ueber den gegenwärtigen Stand der chem. Forschung des Tuberkelbazillus. — Z. f. Naturwissensch. 1931, p. 202. cfr. Z. physiol. Chemie 201, 192; 217, 115.

COURMONT. — Cultures liquides homogènes et mobilité des bacilles acido-résistants. — C. r. de la Soc. de Biol. 1902, p. 1355.

CUENI J. — Le métabolisme lipido-protéique chez le sujet normal et dans différentes affections d'hyperlipémie. — Thèse Strasbourg 1934.

CORPER H. J. — The lysis of tubercle bacilli in vitro. — Amer. Rev. Tbc. 23. 56-65.

DADDI G. — Sulla composizione chimica del bacillo di Koch. — Sotta Tbc. 2, 364-378.

DERRS. M. — Untersuchung über die Beeinflussung der Säurefestigkeit des Tuberkelbazillus duch Saponine. — Z. Tbk. 72, 27-30.

DESSY. — J. composti chimici del bacillo tuberculare e loco attirita biologica. — Boll. Ist. sieroter Milan. 13, 497-511.

DEYCKE. — Zur Biochemie der Tuberkelbazillen. — Münch. Med. Wochenschr. 1910 Nr. 12. cfr. Berlin. Klin. Wochenschrift 1910, Nr. 35.

DU MONT H. — Ueber Polysacharide in Tuberkelbazillen. — Hoppe-Seylers Z. 211, 97-102.

FICHERA S. — L'acido resistenza del bacillo di Koch. — Boll. soc. ital. Biol. 6, 245-247.

FREYMUTH. — Ueber das Verhalten des Grasbazillus II im Kaltblüterorganismus. — Z. f. Bakteriolog. 29, 530.

GEORGESCU. — Recherches biochimiques sur le Grasbacillus II. — Thèse Strasbourg 1930.

HECHT. — Z. phys. Chemie 231, 29.

HORMAECHE u. FRANK HUGHES. — Ueber die Autolyse in Vitro des Tuberkelbazillus. — Z. Tbk. 35, 356.

HERR. — Ein Beitrag zur Verbreitung säurefester Bakterien. — Z. f. Hyg. Bd. 38.

JELIN W. — Ueber das Schicksal des Timothebazillus im tierischen Organismus und über durch diesen Bazillus hervorgerufene pathologisch-histologische Veränderungen. — I. Mit Zbl. Bakter. 108, 41-49.

JOHNSON u. BROWN. — J. of biol. Chemie 54, 72.

JOHNSON. — Treat chemistry of bacteria. — Columbia university 14 M. 1927. cfr. J. amer. chem. soc. 1923, 1823; 1925, 2838. J. of biol. chemie 57, 199; 90, 57.

ISALOLINSKY M. — Zur Frage der Bakteriolyse bei Tuberkelbazillen. IV. Mitt. Z. Immunitätsforschung 54, 285-291.

KALLOS. — Zbl. Tbk.-Forschung 2, 1.

KANOCZ D. — Das aus Meerschweinchenlunge gewonnene fettspaltende Ferment und dessen Wirkung auf den Tuberkelbazillus. — Z. Tbk. 53, 124-128.

KARWACKI L. — L'influence du temps sur la vitalité des cultures des bacilles acido-résistants. — C. r. Soc. Biol. Paris 99.

KIRCHNER O. — Spezielle Bakteriologie der Tuberkulose. — Jahresbericht der Tbk.-Forschung 1928.

— Methodisches zum Problem der Virulenzsteigerung der apathogenen Säurefesten. — Hoppe-Seylers Z. 34, 583.

KOGANEI. — Biochem. J. Japan 1922 i 353.

KRAUT H. — Ueber die Spaltbarkeit von Tuberkelfett durch Lipasen I. — Mitt. Hoppe-Seylers Z. 209, 49-58.

LEMELLAND. — Recherches chimiques et physiologiques sur le dosage des lipides. — Bull. soc. Biol. 1921, 3, p. 134; 1922, 4, p. 301.

LOBSTEIN E. — Recherches biochimiques sur le bacille tuberculeux. — Thèse Strasbourg 1922.

LOEWENSTEIN. — Zbl. f. Bakteriol. Bd. 53.

LONG E. R. — Die Chemie der Tuberkelbazillen. — Eine Uebersicht. Z. Tbk. 64, 78-84.

MACHEBŒUF. — Bull. soc. chimie biol. 1926, VIII p. 464; 1934, p. 174, id. p. 355. Etudes chimiques sur le bacille tuberculeux.

MALER S. — Some sources of acid fast bacilli amer. Rev. Tbk. 19, 376.

MARBAIS S. — La bactérie ou le cérat du bacille de Koch. — Schweiz. med. Wochenschr. 1931, II.

MASUCCI P. — The preparation and chemical composition of timothy-bacillus polysacharide M. B. 200. — Zbl. Tbk.-Forschung 35, 808.

MAXIM. — Die Kohlenhydratfraktion der Tuberkelbazillen und des Tuberkulins der d'Mannose, d'Arabinose. — Biochem. Z. 223, 404-407.

Mc. ALPINE K. — Biochemical studies of bacteriel derivatives XV. Changesin the chemical and biological properties of human tubercle bacillus polysacharide M. B. 200 produced by mild acid hydrolysis. — Amer. Rev. Tbk. 24, 729-745.

MODEL. — Z. Tbk. 53, 227.

MOELLER A. — Mikroorganismen, die den Tuberkelbazillen verwandt sind und bei Tieren eine miliare Tuberkelkrankheit verursachen. — Deutsche med. Wochenschr. 1899, 376-379.

MUCCI P. — Biochemical studies of bacteriel derivatives. — Soc. exp. Biol. a med. 27, 661-663; Amer. Rev. Tbk. 22, 678-684.

MUCH H. — Immunität. — Handbuch der Tuberkulose 1914, p. 190.

MUELLER H. — Die Bedeutung der Lipoide in der Tuberkulose. Zbl. Tbk.-Forschung 35, 601.

NAKAZAWA K. — Serologische Forschungen über das Lipoid von säurefesten Bazillen. — Kyoto Ikadaigaku Zasshi 2, 675-730, deutsche Zusammenfassung.

PANGBORN. — The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli XXV. The composition of the phosphatide fraction of the timothy bacillus. — J. of biol. chemie 94, 165-172.

PHILIBERT. — Les pseudobacilles acido-résistants, Thèse méd. Paris 1908.

PICK u. SILBERSTEIN. — Handbuch pathogener Mikroorganismen 2, 311.

PINER M. — Atypical acid fast microorganismus IV. Smooth-growing tubercle bacilli. — Amer. Rev. Tbk. 32, 440-445.

PLOETNER K. — Nephelometrische Untersuchungen der Bluteiweisskörper. — Biochem. Z. 286, Heft 5-6.

RUPPEL. — Z. physiol. Chemie 26, 218.

SARTORY A. et R., MEYER I. — Contribution à l'étude des mutations du bacille tuberculeux sous l'influence de certains milieux de cultures. — Congrès de Liége, novembre 1934.

SARTORY A., MEYER I., SAUTER Ch. — Application de la méthode de Hecht au diagnostic de la tuberculose (importance du facteur complément). — Congrès de l'A.F.A.S., Nantes 1935.

SABIN T. R. — Cellular reactions to wax like materials from acid fast bakteria. — J. exp. med. 62, 715-769; 52 supl. 3, 3; 56, 867; J. of biol. chemie 83, 505, Physiol. Rev. 12, 141; 12, 140.

SCHMITZU. — Ein Beitrag zur Kumagava-Suto'schen Fettbestimmungsmethode. — Biochem. Z. 28, 237, 1910.

SEIBERT. — J. of biol. Chemie 78, 345, 23; J. of Immun. 24, 149.

SPIELMANN. — J. biol. Chemie 106, 87.

STOBIE W. — The chemistry of the tubercle bacillus. — Tub. 12, 416-419.

TAMURA S. — Prüfung der Kumagava-Suto'schen Fettbestimmungsmethode hinsichtlich der Oxydation der Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen im Verlaufe des Verfahrens. — Biochem. Z. Bd. 51, 1913, p. 643.

— Zur Chemie der Bakterien. — Z. phys. Chemie 87, p. 85, 93.

TERROINE. — Contribution à la connaissance de la physiologie des substances grasses et lipoïdiques. — Thèse Doct. ès sciences, Paris 1919. Ann. des Sc. naturelles, Zoologie, 10e série 1919, p. 1-397.

THOMAS P. — Cours de Chimie biologique Paris.

THOMSON. — Studies on soprophytic acid fast bakteria. — Amer. Rev. Tbc. 26, 162-178.

Tuberkulose-Arbeiten am Kaiserlichen Gesundheitsamt. Vergleichende Untersuchungen über Tuberkelbazillen verschiedener Herkunft. — Heft 3, p. 142. Literatur Bd. XIX. 1903; Bd. I, II, Literaturangaben über die gesamten Veröffentlichungen bis 1904.

TYABII A. — Die Biochemie der säurefesten Bakterien. Nach einem Vortrag am chem. physiol. Institut in Zürich. — Z. f. Bakt. 1935, p. 241-259.

VASSILION. — Biologisch-chem. Forschungen über den Tuberkelbazillus. — Zbl. Tbk. 54, 219.

VOIT. — Z. f. Biol. 1926, 84, 153-168.

WEISS. — Zur Morphologie des Tbc-virus unter besonderer Berücksichtigung einer Doppelfärbung. — Berl. Klin. Wochenschr. 1909, Nr. 40.

WHITTE P. — On the relation of the alcohol soluble constituents of bakteria to their spontaneous agglutination. — — J. of Pathol. a. Bakteriol. 1927, 30, 113-132.

WINDAUS. — Z. f. physiol. Chemie 1910.

WITEBSKY E. — Die chem. serolog. Analyse des Tuberkelbazillus. Ergebnisse der Tuberkulose-Forschung, Bd. V, 1933.

— Ergebnisse der gesamten Tuberkulose-Forschung. — Bd. V, Literaturverzeichnis der neueren Veröffentlichungen, p. 172-198.

TABLE DES MATIÈRES.

pages

Introduction 9

Chapitre I:

Historique 12

Chapitre II:

Etude de la morphologie du Grasbacillus 31

Essais culturaux sur milieux naturels ou synthétiques pour l'obtention de récoltes optimas 31

Chapitre III:

Extraction des globulines et albumines labiles des bactéries à l'aide d'une solution physiologique de chlorure de sodium 37

Séparation des globulines labiles 40

Séparation des albumines labiles 41

Dosage pondéral des globulines et albumines 42

Dosage des lipides 43

L'acido-résistance des globulines et albumines labiles .. 4

Chapitre IV:

Extraction des globulines et albumines stables 49

Dosage des acides gras et de l'insaponifiable total 50

Détermination de l'indice d'iode des acides gras 52

Dosage du cholestérol total, calcul de l'insaponifiable X. 53

Chapitre V:

Détermination des globulines et albumines par macération 57

Chapitre VI:

Examen microscopique des produits de fractionnement 69

Conclusions 73

Bibliographie: 77